



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Programa de Doctorado en Ciencias con Mención en Química

Obtención y caracterización de nanocompuestos de liberación controlada de principios activos de aceites esenciales con actividad antimicrobiana para potencial uso en empaque de frutillas (*Fragaria* × *ananassa*)

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Química

VICTOR HAROLDO CAMPOS REQUENA
CONCEPCIÓN - CHILE
2014

Profesor Tutor: Dr. Bernabé L. Rivas Quiroz
Profesor Co-tutor: Dra. Mónica Pérez Rivera
Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción



DIRECCIÓN DE
POSTGRADO

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Químicas
Programa de Doctorado en Ciencias con Mención en Química

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

Alumno: VICTOR HAROLDO CAMPOS REQUENA

Tesis: "OBTENCION Y CARACTERIZACION DE NANOCOMPUESTOS DE LIBERACION CONTROLADA DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE ACEITES ESENCIALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA POTENCIAL USO EN EMPAQUE DE FRUTILLAS (Fragaria x Ananassa)"

Fecha: 07 DE NOVIEMBRE DE 2014

CALIFICACIÓN

Concepto: *Sobresaliente*

Puntaje: *6.9*

COMISIÓN EXAMINADORA:

PROFESOR(A):

Prof. Bernabé L. Rivas Q., Profesor Guía
Dpto. De Polímeros
Facultad De Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

Prof. Mónica Perez R, Co-tutor
Dpto. De Polímeros
Facultad De Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

Prof. Mohamed R. Dahrouch, Miembro Comisión
Dpto. De Química Orgánica
Facultad De Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

Prof. Mario Suwalsky W., Miembro Comisión
Dpto. De Polímeros
Facultad De Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

Prof. Francisco Martínez D., Examinador Externo
Dpto. Ciencia de los Materiales
Facultad De Ciencias Físicas y Matemáticas
Universidad de Chile

Prof. Patricio Reyes Nuñez
Firma y Timbre Director de Programa

FIRMA:

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

[Signature]

Pauta de Evaluación:

Concepto	Puntaje
Sobresaliente	6.7 - 7.0
Aprobado con Distinción	6.1 - 6.6
Aprobado	5.0 - 6.0

Por el desarrollo libre del Espiritu

Edmundo Larenas N° 234 • Fono: (56 - 41) 204488 • Fax: (56 - 41) 223029 • Ciudad Universitaria • Concepción • Chile e-mail: graduado@udec.cl <http://www.udec.cl/postgrado>

Mayo - 2012

AGRADECIMIENTOS

A CONICYT por el financiamiento vía Beca de Estudios de Doctorado en Chile 2009 N° 21090205, Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral en Chile 2011 N° 24110010 y Beca Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para Estudiantes de Doctorado 2013 N° 81130087. A MECESUP por el financiamiento vía Beca de Pasantía Doctoral en el Extranjero, Programa MECE 2 Educación Superior - UCH0601 “Proyección de la Red Nacional de Programas de Doctorado en Química a la Globalización y Tecnologías del siglo XXI” 2011; y a Red Universitaria Cruz del Sur por financiamiento vía Beca de Movilidad Universitaria Red Cruz del Sur para pasantía doctoral en Chile 2012. Al Proyecto FONDEF (Grant No DI0i1234).

A mis profesores tutores Dr. Bernabé Rivas Q. y Dra. Mónica Pérez R. por el apoyo y la confianza depositada en este proyecto de tesis doctoral.

Al Dr. Eduardo Pereira de la Facultad de Ciencias Químicas, UdeC por su apoyo en los análisis de HPLC. Al Dr. David Contreras de la Facultad de Ciencias Químicas, UdeC por facilitar los softwares de quimiometría. Al Dr. Carlos Figueroa y Dr. Eugenio Sanfuentes de la Facultad de Ciencias Forestales, UdeC por el apoyo en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Al Dr. Manfred Wilhelm y su equipo en el Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Alemania, por su apoyo durante mi pasantía doctoral para la realización de análisis y caracterización de nanocompuestos. Al Dr. Eduardo Muñoz del Laboratorio de Electroquímica, Instituto de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, durante mi pasantía doctoral por su apoyo para la realización de microfotografías por AFM de nanocompuestos. A Mónica Uribe de GEA, UdeC por el apoyo en los análisis de difracción de rayos X.

A Prof. Mario Vega H., Dr. Mario Aranda B., y Dra. Gisela Ríos G. del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, UdeC por su apoyo y ayuda durante la realización de mi tesis doctoral. Al Dr. Carlos Calvo M., Facultad de Farmacia, UdeC por su apoyo otorgado para poder realizar mi doctorado.

Al equipo de trabajo del Departamento de Polímeros y CIPA, Facultad de Ciencias Químicas, UdeC: Karla, Daniela, Lorena, Claudia, Jacqueline, Mario, Leandro, Hernán, Natali, Bruno, Julio, Yesid, Eli, Bernardita y a todos los alumnos de pasantía por acogerme e integrarme al equipo de trabajo durante mi tesis doctoral, lo pasé muy bien acompañado de todos ustedes.

A mi familia: a mi amada esposa, la nueva Dra. María Daniela Barrera (porque mereces tanto el grado de Dr. como yo) por su amor e incondicional apoyo. A mis amados hijos Tomás y Javier. A mi padre Víctor, mi madre Rosa y mis hermanas Nélyda y Nydia.

A la Prof. Marta Torres Sepúlveda, mi primera profesora. Recuerdo exactamente cada una de sus palabras y todo lo que hizo por mí, estaré siempre agradecido de Ud.

RESUMEN

Se sintetizó, caracterizó y evaluó *in vitro* e *in vivo* dos potenciales materiales de empaque activo con actividad antifúngica para frutillas (*Fragaria × ananassa*), uno a base de nanocompuestos de polietileno de baja densidad (PEBD) sintetizados por mezclado en estado fundido, y otro a base de bionanocompuestos de almidón termoplastificado (ATP) por medio de extrusión, utilizando nanoarcillas orgánicamente modificadas a base de montmorillonita (MOM), y cargando estos nano/bionanocompuestos con carvacrol y timol como drogas antifúngicas. Mediante diseño de experimentos (DOE), regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR) y metodología superficie respuesta (RSM) se logró optimizar las formulaciones y las condiciones de síntesis para ambos materiales logrando estructuras intercaladas/exfoliadas con propiedades mecánicas, morfológicas y térmicas óptimas.

Se estudió el control de la liberación de droga desde estos films por difusión hacia el simulador de alimentos y la pérdida de droga por volatilización hacia el ambiente. Hacia el simulador de alimento, la liberación muestra una difusión de tipo Fickeana para PEBD/MOM, y para ATP/MOM se libera rápidamente (liberación *burst*) debido a la interacción del almidón termoplástico con la disolución acuosa del simulador. Los parámetros cinéticos y de difusión disminuyeron significativamente con respecto al polímero solo, controlándose así la liberación de droga, siendo la intercalación la variable que controla principalmente la liberación. La pérdida de droga por volatilización hacia el ambiente para ambos materiales sigue una cinética de primer orden, y muestra que para PEBD/MOM el control de la liberación a corto plazo está modelado por la interacción nanoarcilla/carcacrol, y la liberación a largo plazo por la intercalación de la matriz. Para films de ATP/MOM la liberación es más rápida que para PEBD/MOM debido a la diferencia de afinidad del principio activo con las matrices, y siendo la temperatura un factor que disminuye la difusión de droga para ambos materiales, reteniéndose a 4 y -18 °C más del 60 – 70 % de la droga al cabo de 2 meses de almacenamiento, siendo esto un “tiempo de guarda” para estos materiales antes de ser usados.

Las pruebas de empaque de frutillas con los nano/bionanocompuestos optimizados demostraron que las CI_{50} *in vivo* de mezcla carvacrol/timol (50:50) efectivas sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* o *Rhizopus stolonifer* no alteran significativamente ($p < 0,05$) las propiedades organolépticas ni los parámetros de calidad (firmeza, pérdida de masa y cambio de color), y estas fueron de 13,23 y 5,90 mg de droga total por gramo para PEBD/MOM y ATP/MOM respectivamente, las cuales son efectivas tanto por contacto directo como por contacto indirecto con los frutos.

ABSTRACT

Two potential materials with antifungal activity for active packaging for strawberries (*Fragaria × ananassa*) were synthesized, characterized and evaluated *in vitro* and *in vivo*, one based on low-density polyethylene (LDPE) nanocomposites obtained by melt intercalation, and the other one based on thermoplastic starch (TPS) bionanocomposites obtained by melt extrusion, using organically modified montmorillonite (OMM) as filler, and both materials loaded with carvacrol and thymol as antifungal drugs.

By using design of experiments (DOE), partial least squares regression (PLSR) and response surface methodology (RSM), formulations and processing parameters were optimized for both materials achieving intercalated/exfoliated structures with optimal mechanical, morphological and thermal properties.

Drug release of these films by diffusion towards food simulator and loss of drug by volatilization towards the ambient were studied. Drug release on food simulator shows a Fickian-type diffusion for LDPE/OMM, and a burst release for TPS/OMM due to a TPS/aqueous food simulator interaction. A significant decrease on kinetic and diffusion parameters respect neat polymer was found, showing a control drug release mainly due to the intercalation variable. The loss of drug by volatilization followed a first order kinetic for both materials, and in the case of LDPE/OMM it showed a short-time control release modeled by nanolayered/carvacrol interaction, and a long-time control release modeled by the matrix intercalation.

Faster drug release was achieved with TPS/OMM films compared with LDPE/OMM. This is due to the different affinity of drugs with both matrices, and being the temperature a variable that decreased drug diffusion in both matrices, retaining more than 60 – 70 % of the drug at 4 and – 18 °C after two months of store, which is considered as a “holding time” for these materials before its use.

Strawberries packing assays with optimized nano/bionanocomposites gave as result that *in vivo* IC₅₀ of carvacrol/thymol mixture (50:50) over inoculated strawberries with *Botrytis cinerea* or *Rhizopus stolonifer* did not affect significantly ($p < 0,05$) neither organoleptic properties nor quality parameters (firmness, loss weight and external color change), and these IC₅₀ were 13,23 and 5,90 mg of total drug per gram of film for LDPE/OMM and TPS/OMM respectively, which were effective for both direct and indirect contact with fruits.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	3
Abstract.....	4
Abreviaciones.....	20
CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN	
1.1. Frutos frescos y berries en Chile.....	23
1.2. Aceites esenciales de plantas y especias.....	24
1.3. Envases activos en alimentos.....	29
1.4. Nanocompuestos y bionanocompuestos.....	32
1.5. Liberación controlada de agentes antimicrobianos desde nanocompuestos.....	37
1.6. Antecedentes de la propuesta de tesis doctoral.....	38
CAPÍTULO 2 – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1. Hipótesis.....	40
2.2. Objetivo general.....	40
2.3. Objetivos específicos.....	40
CAPÍTULO 3 – MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. REACTIVOS.....	42
3.2. METODOLOGÍA	
3.2.1. Síntesis de nano/bionanocompuestos	
3.2.1.1. <i>Síntesis de nanocompuestos de poli(etileno) de baja densidad (PEBD) con montmorillonita orgánicamente modificada (MOM).....</i>	43
3.2.1.2. <i>Síntesis de bionanocompuestos de almidón de maíz termoplastificado (ATP) con montmorillonita orgánicamente modificada (MOM).....</i>	43
3.2.1.3. <i>Síntesis de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con principios activos de aceites esenciales.....</i>	44
3.2.1.4. <i>Síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM cargados con principios activos de aceites esenciales.....</i>	44
3.2.2. Caracterización de nano/bionanocompuestos	
3.2.2.1. <i>Análisis morfológico de nano/bionanocompuestos.....</i>	44
3.2.2.2. <i>Análisis térmicos de nano/bionanocompuestos.....</i>	45
3.2.2.3. <i>Análisis mecánicos y reológicos de nano/bionanocompuestos.....</i>	45
3.2.2.4. <i>Análisis de microscopía: AFM y TEM.....</i>	45

3.2.2.5. Cuantificación de principios activos de aceites esenciales en nano/bionanocompuestos.....	46
3.2.2.6. Análisis de homogeneidad de contenido de carvacrol en nano/bionanocompuestos.....	46
3.2.3. Optimización de la formulación y las condiciones de proceso para la síntesis de nano/bionanocompuestos.....	47
3.2.4. Estudio <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol y timol sobre <i>Botrytis cinerea</i>	48
3.2.5. Estudio del control de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos	
3.2.5.1. Estudio del control de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia simulador de alimento.....	50
3.2.5.2. Estudio del control de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia el ambiente circundante.....	51
3.2.6. Efecto de la temperatura en la liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos	
3.2.6.1. Efecto de la temperatura en el perfil de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia simulador de alimento.....	51
3.2.6.2. Efecto de la temperatura en el perfil de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia el ambiente circundante.....	52
3.2.7. Estudio <i>in vivo</i> del efecto antifúngico de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre frutillas (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Rhizopus stolonifer</i>	52
3.2.8. Análisis sensorial de frutillas (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) tras tratamiento con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol.....	54
3.2.8.1. Prueba sensorial de medición del grado de satisfacción con escala hedónica verbal.....	55
3.2.8.2. Prueba sensorial discriminativa triangular.....	56
3.2.9. Análisis de calidad de frutillas (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) tratadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol	
3.2.9.1. Análisis de pérdida de masa.....	58
3.2.9.2. Análisis de color externo.....	59
3.2.9.3. Análisis de firmeza.....	59

3.2.10. Análisis estadístico de datos.....	59
--	----

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis, caracterización y optimización de las propiedades de empaque de nano/bionanocompuestos.....	61
4.1.1. Optimización de las propiedades de empaque de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido: primer diseño de experimentos.....	61
4.1.2. Optimización de las propiedades de empaque de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido: segundo diseño de experimentos.....	71
4.1.3. Optimización de las propiedades de empaque de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión: primer diseño de experimentos.....	86
4.1.4. Optimización de las propiedades de empaque de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión: segundo diseño de experimentos.....	95
4.2. Estudio <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de films de nanocompuestos sobre <i>Botrytis cinerea</i>	103
4.3. Estudio de la liberación de principios activos derivados de aceites esenciales desde nano/bionanocompuestos	
4.3.1. Migración de agentes antimicrobianos desde films poliméricos hacia alimentos.....	107
4.3.2. Estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento.....	110
4.3.3. Estudio de liberación de carvacrol desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM hacia simulador de alimento.....	125
4.3.4. Estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM por volatilización hacia el ambiente.....	127
4.3.5. Estudio de pérdida de carvacrol desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM por volatilización hacia el ambiente.....	139
4.4. Efecto de la temperatura en la liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos.....	145

4.5. Estudio <i>in vivo</i> del efecto antifúngico en frutillas (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) de films de nano/bionanocompuestos cargados con principios activos de aceites esenciales	
4.5.1. Efecto antifúngico <i>in vivo</i> de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol sobre frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> por contacto indirecto con los films.....	149
4.5.2. Análisis sensorial de frutillas: prueba de medición del grado de satisfacción con escala hedónica verbal.....	151
4.5.3. Efecto antifúngico <i>in vivo</i> de nano/bionanocompuestos cargados con mezcla carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> por contacto indirecto con los films.	153
4.5.4. Análisis sensorial de frutillas: prueba discriminativa triangular.....	157
4.5.5. Efecto antifúngico <i>in vivo</i> de nano/bionanocompuestos cargados con mezcla carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con <i>Rhizopus stolonifer</i> por contacto directo e indirecto con films.....	159
4.6. Evaluación de la calidad de frutillas (<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>) empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol	
4.6.1. Pérdida de masa.....	161
4.6.2. Color externo.....	163
4.6.3. Firmeza.....	165
CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES	
5.1. Conclusiones.....	167
5.2. Perspectivas.....	171
REFERENCIAS.....	172
ANEXOS	
A. Tablas.....	184
B. Publicaciones.....	190
C. Participaciones en eventos.....	206

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Pudrición gris (<i>Botrytis cinerea</i>) en <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	23
Figura 1.2. Mecanismos de acción de los componentes de aceites esenciales en la célula microbiana.....	26
Figura 1.3. Estructura química de carvacrol y timol.	28
Figura 1.4. Estructura de la montmorillonita sódica.....	34
Figura 1.5. Diferentes tipos de estructuras que resultan de la interacción entre capas de silicatos y polímeros en la síntesis de nanocompuestos.....	34
Figura 1.6. Estructura química de surfactantes empleados como organomodificadores en nanoarcillas (a) octadecilamina, (b) metil dihidroxietil octadecilamina, (c) dimetil dialquil(C14-C18) amina, (d) incremento del espacio interlaminar en arcillas con organomodificadores.....	36
Figura 3.1. Ensayo <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de films de nanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre micelios de <i>Botrytis cinerea</i> : (a) por contacto directo con los films, y (b) por contacto indirecto con los films.....	49
Figura 3.2. Esquema del ensayo <i>in vivo</i> del efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos cargados con principios activos derivados de aceites esenciales sobre frutillas inoculadas con hongos. (a) ensayos por contacto con el film, y (b) ensayos por contacto indirecto con el film mediante vapores de principios activos en el espacio cabeza.....	52
Figura 3.3. Modelos de prueba para ensayos <i>in vivo</i> de films de nanocompuestos en frutillas.....	53
Figura 3.4. Bandeja presentada a los jueces en la prueba sensorial de medición del grado de satisfacción con escala hedónica verbal para frutillas tratadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol.	55
Figura 3.5. Bandeja presentada a los jueces en la prueba sensorial discriminativa triangular para frutillas tratadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol.....	57
Figura 4.1. A la izquierda: difractogramas de DRX nanocompuestos de PEBD/MOM con 5 %m/m de nanoarcilla (a) Nanomer [®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina), (b) Nanomer [®] I.30E (octadecilamina), (c) Nanomer [®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina), (d) Nanomer [®] montmorillonita sódica. A la derecha microfotografía TEM de nanocompuesto de PEBD/MOM utilizando Nanomer I.44P al 5 %m/m en la formulación.	62
Figura 4.2. (a) Gráfico de valores observados vs. valores predichos de distancia interlaminar d_{001} del modelo obtenido por MLR para síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido. (b) Gráfico de coeficientes del polinomio para la respuesta d_{001} calculados por MLR: (b_1) velocidad de mezcla v_{mix} ; (b_2) tiempo de mezcla t_{mix} ; (b_3) temperatura de mezcla T_{mix} ; (b_4) %Arcilla; (b_{12}) interacción $v_{mix} \times t_{mix}$; (b_{23}) interacción $t_{mix} \times T_{mix}$	66
Figura 4.3. Gráfico de efectos de las variables sobre la distancia interlaminar d_{001} medida en films de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido. Se indica el intervalo de confianza del 95 % en cada gráfico.....	68
Figura 4.4. Gráfico de interacciones entre variables para la respuesta de distancia interlaminar d_{001} medida en films de PEBD/MOM: (a) interacción entre v_{mix} y t_{mix} , (b) interacción entre T_{mix} y t_{mix}	69

Figura 4.5. Gráfico de contorno 2D y mapas de superficie respuesta 3D para la respuesta de distancia interlaminar d_{001} en films de nanocompuestos de PEBD/MOM: (a) T_{mix} vs. %Arcilla con valores fijos de $t_{\text{mix}} = 10$ min y $v_{\text{mix}} = 40$ rpm, (b) T_{mix} vs. t_{mix} con valores fijos de $v_{\text{mix}} = 50$ rpm y %Arcilla = 3,5 %m/m, (c) t_{mix} vs. v_{mix} con valores fijos de $T_{\text{mix}} = 130$ °C y %Arcilla = 3,5 %m/m, (d) T_{mix} vs. t_{mix} con valores fijos de $v_{\text{mix}} = 50$ rpm y %Arcilla = 3,5 %m/m.....	70
Figura 4.6. Gráficos de valores observados vs. valores predichos de las respuesta modeladas tras 4 PLS-componentes para en análisis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM. (a) y_1 distancia interlaminar d_{001} , (b) y_2 temperatura de descomposición $T_{0.05}$ con transformación lineal $2y$, (c) y_3 temperatura de fusión T_m , (d) y_4 módulo de Young E , (e) y_5 módulo de pérdida G'' , con transformación $y^{0.25}$, y (f) y_6 módulo de almacenamiento G' con transformación $\log(y)$	75
Figura 4.7. Representación geométrica de PLSR. (a) Proyecciones (círculos negros) de las nuevas variables t obtenidas del espacio x -variables en un nuevo PLS-componente. El número de ejes X es el número de x variables del experimento. (b) Proyecciones de las nuevas variables u obtenidas del espacio y -respuestas en un nuevo PLS-componente. El número de ejes Y es el número de y respuestas medidas en el experimento. (c) Gráfico relacionando las nuevas coordenadas t y u en un PLS-componente dado.....	77
Figura 4.8. Gráficos de <i>scores</i> u vs. t obtenidos por PLSR para el segundo diseño experimental CCC en cada PLS-componente, (a) primer PLS-componente $R^2 = 0,941$, (b) segundo PLS-componente $R^2 = 0,774$, (c) tercer PLS-componente $R^2 = 0,397$, y (d) cuarto PLS-componente $R^2 = 0,467$. Cada punto en el gráfico es un experimento del diseño.....	78
Figura 4.9. Gráfico de <i>loadings</i> del segundo diseño de experimentos obtenido por PLSR: <i>loadings</i> del primer componente (w_1c_1) vs. <i>loadings</i> del segundo componente (w_2c_2), correlacionando cuatro variables (■), tres interacciones entre variables (●) y seis respuestas (○).....	79
Figura 4.10. Interpretación del gráfico de <i>loadings</i> por PLSR para cada respuesta: <i>loadings</i> del primer componente (w_1c_1) vs. <i>loadings</i> del segundo componente (w_2c_2). (■) variables, (○) respuestas, e (●) interacciones entre variables.....	81
Figura 4.11. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos tras 4 PLS-componentes para las variables individuales (x_n) y las interacciones entre variables (x_nx_m and x_n^2) para cada respuesta del segundo diseño experimental CCC.....	82
Figura 4.12. Gráficos de <i>loadings</i> obtenidos por PLSR que incluye los <i>loadings</i> del tercer (w_3c_3) y cuarto (w_4c_4) PLS-componente con cuatro variables (■), seis respuestas (○) y tres interacciones entre variables (●). (a) gráfico de <i>loadings</i> del primer y tercer PLS-componente, (b) gráfico de <i>loadings</i> del primer y cuarto PLS-componente.....	83
Figura 4.13. Gráficos superficie respuesta 3D y gráficos de contorno 2D para cada respuesta y obtenidos por PLSR: (a) y_1 distancia interlaminar a $T_{\text{mix}} = 130$ °C y $t_{\text{mix}} = 7$ min, (b) y_2 temperatura de descomposición a %Arcilla = 7,0 %m/m y $T_{\text{mix}} = 170$ °C, (c) y_3 temperatura de fusión a %Arcilla = 7,0 %m/m y $T_{\text{mix}} = 170$ °C, (d) y_4 módulo de Young a %Arcilla = 3,0 %m/m y $T_{\text{mix}} = 130$ °C, (e) y_5 módulo de pérdida a %Arcilla = 3,0 %m/m y $T_{\text{mix}} = 130$ °C, y (f) y_6 módulo de almacenamiento = 3,0 %m/m y $T_{\text{mix}} = 130$ °C.....	84
Figura 4.14. (a) y (b) Mapas superficie respuesta para distancia interlaminar d_{001} . Micrografías AFM de nanocompuestos de PEBD/MOM con (c) %Arcilla = 3,0 %m/m de Nanomer® I.44P, %Comp. = 4,0 %m/m, $T_{\text{mix}} = 130$ °C, $t_{\text{mix}} = 7$ min, y $v_{\text{mix}} = 50$ rpm. (d) %Arcilla = 5,0 %m/m de Nanomer® I.44P, %Comp. = 8,0 %m/m, $T_{\text{mix}} = 150$ °C, $t_{\text{mix}} = 14$ min, y $v_{\text{mix}} = 50$ rpm.....	85

Figura 4.15. A la izquierda: difractogramas por DRX (a) bionanocompuestos de ATP/Nanomer [®] I.30E (octadecilamina) al 5 %m/m, (b) Nanomer [®] montmorillonita sódica sola, (c) bionanocompuestos de ATP/Nanomer [®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina) al 5 %m/m, (d) bionanocompuestos de ATP/Nanomer [®] montmorillonita sódica al 5 %m/m, (e) ATP sin nanoarcilla. A la derecha: microfotografías TEM de bionanocompuestos ATP/MOM con (g) Nanomer [®] I.34TCN al 5 %m/m, (f) Nanomer [®] montmorillonita sódica al 5 %m/m.....	86
Figura 4.16. Proceso de intercalación de almidón en nanoarcillas.....	87
Figura 4.17. Gráfico de valores observados vs. valores predichos para cada respuesta modelada tras 3 PLS-componentes para la optimización de síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM. (a) y_1 distancia interlaminar d_{001} con transformación $(y - 6)^{0.5}$ (b) y_2 temperatura de descomposición $T_{0.10}$ con transformación $\log(y)$, (c) y_3 módulo de Young E con transformación $\log(y - 74)$	90
Figura 4.18. Gráficos de <i>scores</i> u vs. t obtenidos por PLSR para el diseño experimental FFD en cada PLS-componente, (a) primer componente $R^2 = 0,911$, (b) segundo componente $R^2 = 0,733$, (c) tercer componente $R^2 = 0,471$. Cada punto en el gráfico corresponde a un experimento del diseño.....	90
Figura 4.19. Gráfico de los coeficientes normalizados de regresión (b) obtenidos tras 3 PLS-componentes para cada respuesta en el modelo para la optimización de síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.....	91
Figura 4.20. Gráfico de efectos de la variable T_{mix} sobre la respuesta de (a) distancia interlaminar d_{001} , (b) temperatura de descomposición $T_{0.10}$, y (c) módulo de Young E medida en films de nanocompuestos de ATP/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido, indicándose el intervalo de confianza del 95 % en cada gráfico. Gráfico de interacciones entre v_{mix} y %Plastif. para las respuestas (d) distancia interlaminar d_{001} , (e) temperatura de descomposición $T_{0.10}$, y (f) módulo de Young E medida en films de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión.....	93
Figura 4.21. Gráfico de <i>loadings</i> w_1c_1 vs. w_2c_2 del modelo PLSR para las respuestas (a) distancia interlaminar d_{001} , (b) temperatura de descomposición $T_{0.10}$, y (c) módulo de Young E medidas en films de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión. (■) variables, (●) interacciones entre variables, (○) respuestas.....	92
Figura 4.22. (a) Gráficos de contorno 2D %Plastif. vs. v_{mix} para la respuesta y_3 módulo de Young y (b) gráfico de superficie respuesta 3D %Plastif. vs. T_{mix} para la respuesta y_2 temperatura de descomposición $T_{0.10}$ obtenidos por modelo PLSR tras 3 PLS-componentes: (a) %Arcilla = 3 %m/m, $T_{mix} = 110$ °C, y (b) %Arcilla = 3 %m/m y $T_{mix} = 110$ °C.....	93
Figura 4.23. Gráfico de valores observados vs. valores predichos para cada respuesta modelada tras 4 PLS-componentes para la optimización de síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión. (a) y_1 distancia interlaminar d_{001} con transformación $\log(2y - 15)$ (b) y_2 temperatura de descomposición $T_{0.10}$ con transformación $\log(2y + 10)$ (c) y_3 módulo de Young E con transformación $\log(y - 10)$	97
Figura 4.24. Gráficos de <i>scores</i> u vs. t obtenidos por PLSR para el segundo diseño experimental FFD en cada componente de PLS, (a) con primer componente $R^2 = 0,831$, (b) con segundo componente $R^2 = 0,900$, (c) con tercer componente $R^2 = 0,912$, (d) con cuarto componente $R^2 = 0,470$. Cada punto en el gráfico es un experimento del diseño.....	98

Figura 4.25. Gráfico normalizados de los coeficientes de regresión (b) obtenidos tras 4 PLS-componentes para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta y del segundo diseño experimental FFD para síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.....	100
Figura 4.26. Gráfico de <i>loadings</i> w_1c_1 vs. w_2c_2 del modelo PLSR para segundo diseño de experimentos: (a) distancia interlaminar d_{001} , (b) temperatura de descomposición $T_{0,10}$, y (c) módulo de Young E medidas en films de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión. (■) variables, (●) interacciones entre variables, (○) respuestas.....	101
Figura 4.27. Gráficos de <i>x-scores</i> obtenidos por PLSR para el segundo diseño experimental FFD, (a) gráfico t_1 vs. t_2 , (b) gráfico t_1 vs. t_3 . Cada punto en el gráfico es un experimento del diseño.....	101
Figura 4.28. Selección de fotografías de ensayos en placas de PDA para pruebas <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con principios activos sobre micelios de <i>Botrytis cinerea</i> al 5º día de incubación. (a) nanocompuesto sin principio activo por contacto directo, (b) nanocompuesto con carvacrol 2,5 %m/m por contacto directo, (c) nanocompuesto sin principio activo por contacto indirecto, (d) nanocompuesto con carvacrol 2,5 %m/m por contacto indirecto.....	104
Figura 4.29. Ensayo <i>in vitro</i> de la inhibición del crecimiento de micelios de <i>Botrytis cinerea</i> : a) contacto directo con nanocompuestos de PEBD/MOM/carvacrol ($n = 3$), b) contacto indirecto por vapores de nanocompuestos de PEBD/MOM/carvacrol ($n = 3$)	104
Figura 4.30. Curva de inhibición <i>in vitro</i> de films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con distintas concentraciones de carvacrol sobre micelios de <i>Botrytis cinerea</i> al séptimo día de incubación a 25 °C. (a) contacto directo de los films con el PDA, (b) contacto indirecto por medio de vapores de carvacrol.....	105
Figura 4.31. Ensayo <i>in vitro</i> de la inhibición del crecimiento de micelios de <i>Botrytis cinerea</i> mediante: (a) contacto directo con nanocompuestos de PEBD/MOM/timol ($n = 3$), (b) contacto por indirecto por vapores de nanocompuestos de PEBD/MOM/timol ($n = 3$)	106
Figura 4.32. Curva de inhibición <i>in vitro</i> de films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con distintas concentraciones de timol sobre micelios de <i>Botrytis cinerea</i> al séptimo día de incubación a 25 °C. (a) contacto directo de los films con el PDA, (b) contacto indirecto por medio de vapores de timol.....	106
Figura 4.33. Curvas de liberación de carvacrol en simulador de alimento desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a temperatura ambiente para todas las muestras del diseño experimental D-optimal comparadas con PEBD solo (◇). Experimento N° 18 excluido como <i>outlier</i>	112
Figura 4.34. Gráfico de (a) m_t/m_∞ vs. $t^{1/2}$ y (b) $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs. t para la liberación de carvacrol hacia simulador de alimento a 18 °C desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM para todas las muestras del diseño experimental D-optimal comparado con PEBD solo (◇). Experimento N° 18 excluido como <i>outlier</i>	113

Figura 4.35. Gráfico de valores observados vs. valores predichos para cada respuesta modelada tras 7 PLS-componentes para el estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento a 18 °C. (a) y_1 velocidad de liberación inicial v_0 con transformación $\log(y)$, (b) y_2 constante de velocidad cinética total k_1 con transformación $\log(3y)$, (c) y_3 coeficiente de difusión D con transformación $\log(3y)$, (d) y_4 constante de velocidad de difusión k_d con transformación $\log(3y)$, (e) y_5 temperatura de descomposición $T_{0.10}$ con transformación $(y + 2)^2$, (f) y_6 módulo de Young E , (g) y_7 temperatura de fusión T_m , y (h) y_8 distancia interlaminar d_{001}	117
Figura 4.36. Gráficos de <i>scores</i> u vs. t obtenidos por PLSR para el diseño experimental D-optimal para el estudio de la cinética de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM en simulador de alimento para los primeros cuatro PLS-componente, (a) primer componente $R^2 = 0,822$, (b) segundo componente $R^2 = 0,859$, (c) tercer componente $R^2 = 0,835$, (d) cuarto componente $R^2 = 0,855$. Cada punto en el gráfico corresponde a un experimento del diseño.....	118
Figura 4.37. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos por PLSR (tras 7 PLS-componentes) para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta del diseño experimental D-optimal del estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento a 18 °C. A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer® I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina)	120
Figura 4.38. Modelo de “camino tortuosos” propuesto para explicar el efecto en la disminución de la velocidad de difusión de moléculas producto de la intercalación en nanocompuestos.....	121
Figura 4.39. Gráfico de <i>loadings</i> del primer componente (w_1c_1) vs. <i>loadings</i> del segundo componente (w_2c_2) para el modelo PLSR del diseño D-optimal para liberación de carvacrol hacia simulador de alimento tras 7 PLS-componentes. (○) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer® I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).....	122
Figura 4.40. Gráfico de interacciones entre variables para la respuesta de coeficiente de difusión D para la liberación de carvacrol desde films de PEBD/MOM hacia simulador de alimento a 18 °C. (a) interacción entre %Arcilla y %Comp, (b) interacción entre Tipo de arcilla y %Arcilla. Arcilla A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); Arcilla B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); Arcilla C = Nanomer® I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).....	123
Figura 4.41. Interpretación del gráfico de <i>loadings</i> (primer componente (w_1c_1) vs. segundo componente (w_2c_2)) del modelo PLSR para las respuestas de cinética y difusión de carvacrol: (a) y_1 velocidad de liberación inicial v_0 , (b) y_2 constante de velocidad cinética total k_1 , (c) y_3 coeficiente de difusión D , y (d) y_4 constante de velocidad de difusión k_d . (○) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer® I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).....	124
Figura 4.42. Liberación de carvacrol desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM hacia simulador de alimentos a temperatura ambiente.....	127
Figura 4.43. (a) Gráfico de % de carvacrol remanente en films de nanocompuestos vs. tiempo, (b) gráfico $\ln(C - C_\infty)$ vs. tiempo. Formulaciones con 7 %m/m de Comp y (□) 3 %m/m Nanomer® I.30E (●) 3 %m/m Nanomer® I.34TCN (○) 3 %m/m Nanomer® I.44P (■) PEBD sin nanoarcilla.....	128

Figura 4.44. Gráficos de valores observados vs. valores predichos por PLSR (tras 8 PLS-componentes) para estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C. (a) y_1 ln de % de retención de carvacrol al 3 ^{er} día, (b) y_2 ln de % de retención de carvacrol al 5 ^o día, (c) y_3 ln de % de retención de carvacrol al 10 ^o día, (d) y_4 ln de % de retención de carvacrol al 45 ^o día, y (e) y_5 ln de % de retención de carvacrol al 60 ^o día, (f) y_5 temperatura de descomposición $T_{0,10}$ con transformación y^2 , (g) y_6 módulo de Young E , (h) y_7 temperatura de fusión T_m , e (i) y_8 distancia interlaminar d_{001}	132
Figura 4.45. Gráficos de <i>scores</i> u vs. t obtenidos por PLSR para el diseño experimental D-optimal para el estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C para los primeros cuatro PLS-componentes. (a) primer componente $R^2 = 0,659$, (b) segundo componente $R^2 = 0,903$, (c) tercer componente $R^2 = 0,865$, (b) cuarto componente $R^2 = 0,808$. Cada punto en el gráfico corresponde a un experimento del diseño.....	133
Figura 4.46. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos por PLSR (tras 8 PLS-componentes) para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta del diseño experimental D-optimal para el estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C a diferente tiempo. Arcilla A = Nanomer [®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer [®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer [®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina)	134
Figura 4.47. (a) Gráfico de <i>loadings</i> del primer componente (w_1c_1) vs. <i>loadings</i> del segundo componente (w_2c_2) y (b) gráfico de <i>loadings</i> del primer componente (w_1c_1) vs. <i>loadings</i> del tercer componente (w_3c_3) para el modelo obtenido del diseño D-optimal tras 8 PLS-componentes para evaluar pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente. (▲) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer [®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer [®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer [®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).....	136
Figura 4.48. Gráficos de <i>loadings</i> del primer componente (w_1c_1) vs. <i>loadings</i> del tercer componente (w_3c_3) para el modelo obtenido del diseño D-optimal tras 8 PLS-componentes para evaluar pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente. (▲) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer [®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer [®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer [®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).....	138
Figura 4.49. Gráficos de valores observados vs. valores predichos por PLSR (tras 6 PLS-componentes) para estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C. (a) y_1 temperatura de descomposición $T_{0,50}$ con transformación lineal $4y$, (b) y_2 módulo de Young E con transformación $\log(y)$, y (c) y_3 tiempo $\frac{1}{2}$ de pérdida de carvacrol en el film $\theta_{1/2}$	139
Figura 4.50. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos por PLSR (tras 6 PLS-componentes) para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta del diseño experimental D-optimal para el estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C. Arcilla A = Nanomer [®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer [®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer [®] montmorillonita sódica hidrofílica.....	143
Figura 4.51. Gráficos de <i>x-scores</i> obtenidos por PLSR (tras 6 PLS-componentes) para el diseño D-optimal del estudio de pérdida de carvacrol por volatilización desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C, (a) gráfico t_1 vs. t_2 , (b) gráfico t_1 vs. t_3 . Cada punto en los gráficos es un experimento del diseño.....	144

Figura 4.52. (a) Gráfico $\ln(C - C_{\infty})$ vs. tiempo, y (b) retención vs. tiempo para la pérdida de carvacrol hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con 3 %m/m Nanomer [®] I.44P y 7 %m/m Compatibilizante a: (■) temperatura ambiente de 18 °C, (○) refrigeración de 4 °C, y (▲) congelación de -18 °C.....	147
Figura 4.53. Gráfico de Arrhenius $\ln D$ vs $1/T$ para la pérdida de carvacrol hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con 4 %m/m de compatibilizante: (a) 5 %m/m Nanomer I.30E (b) 5 %m/m Nanomer I.34TCN (c) 5 %m/m Nanomer I.44P; y desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM con 30 %m/m de plastificante: (d) 3 %m/m Nanomer [®] I.30E (e) 3 %m/m Nanomer [®] I.34TCN (f) 3 %m/m Nanomer [®] montmorillonita sódica hidrofílica.....	147
Figura 4.54. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos con diferentes concentraciones de carvacrol sobre frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> tras cinco días de tratamiento ($n = 10$ frutillas por cada nivel de concentración). (a) nanocompuestos de PEBD/MOM con carvacrol, (b) bionanocompuestos de ATP/MOM con carvacrol.....	150
Figura 4.55. Resultados análisis sensorial de grado de satisfacción de frutillas: calificación promedio \pm desviación estándar de (a) frutillas control sin tratamiento, (b) frutillas tratadas con nanocompuestos de PEBD/MOM/carvacrol 40 mg g ⁻¹ por 2 días ($n = 40$)	151
Figura 4.56. Resultados análisis sensorial de grado de satisfacción de frutillas: calificación promedio \pm desviación estándar de (a) frutillas control sin tratamiento, (b) frutillas tratadas con bionanocompuestos de ATP/MOM/carvacrol 15 mg g ⁻¹ por 2 días a temperatura ambiente ($n=39$)..	152
Figura 4.57. Separación cromatográfica por HPLC de (a) carvacrol con $t_R = 14,26$ min, y (b) timol con $t_R = 15,74$ min, presentes en extractos de hexano de muestras de film de nano/bionanocompuestos.....	153
Figura 4.58. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos con diferentes concentraciones totales de carvacrol/timol (50:50) sobre frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> tras cinco días de tratamiento ($n = 9$ por cada nivel de concentración) (a) nanocompuesto de PEBD/MOM con carvacrol/timol (50:50), (b) bionanocompuesto de ATP/MOM con carvacrol/timol (50:50)	155
Figura 4.59. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> empacadas por cinco días, (a) control de frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> , (b) frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> y empacadas en contacto indirecto con films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con 20,09 mg g ⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50)	155
Figura 4.60. Resultados de prueba sensorial discriminativa triangular para tratamientos de frutillas con nanocompuestos de PEBD/MOM con 13 mg g ⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50) por 2 días a temperatura ambiente: nivel de diferencia \pm desviación estándar percibida por el juez en los (a) aciertos al detectar la muestra diferente, (b) en los desaciertos al elegir la muestra diferente ($n = 26$)	158
Figura 4.61. Resultados de prueba sensorial discriminativa triangular para tratamientos de frutillas con bionanocompuestos de ATP/MOM con 6,0 mg g ⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50) por 2 días a temperatura ambiente: nivel de diferencia \pm desviación estándar percibida por el juez en los (a) aciertos al detectar la muestra diferente, (b) en los desaciertos al elegir la muestra diferente ($n = 26$)	158

Figura 4.62. Efecto antifúngico de films de PEBD/MOM cargados con 13 mg g ⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50) y films de ATP/MOM cargados con 6 mg g ⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50) sobre (a) frutillas inoculadas con <i>Rhizopus stolonifer</i> empacadas por cinco días a temperatura ambiente en contacto directo e indirecto con los films (<i>n</i> = 12), (b) sobre frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> empacadas por cinco días a temperatura ambiente en contacto directo con los films (<i>n</i> = 12)	160
Figura 4.63. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con <i>Rhizopus stolonifer</i> empacadas por cinco días, (a) control de frutillas inoculadas con <i>Rhizopus stolonifer</i> , (b) frutillas inoculadas con <i>Rhizopus stolonifer</i> y empacadas en contacto directo con films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con 13 mg g ⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50)	160
Figura 4.64. Microfotografías de (a) <i>Botrytis cinerea</i> en superficie de frutillas infectadas, (b) <i>Rhizopus stolonifer</i> en superficie de frutillas infectadas.....	161
Figura 4.65. Gráfico de pérdida de masa de frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.....	162
Figura 4.66. Diferencia de color (ΔE^*_{ab}) en frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.....	164
Figura 4.67. Análisis de firmeza en frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.....	165



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales componentes de aceites esenciales con propiedades antimicrobianas presentes en plantas.....	25
Tabla 1.2. Ejemplos de actuales envases activos usados como empaque de alimentos.....	31
Tabla 4.1. Primer diseño experimental de tipo factorial completo (FFD) de dos niveles (2^4) para el estudio de parámetros de formulación y proceso en la síntesis de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.....	62
Tabla 4.2. Datos experimentales del primer diseño experimental factorial completo (FFD) de dos niveles (2^4) para la síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.....	63
Tabla 4.3. Evaluación del modelo obtenido por MLR a partir del primer diseño de experimentos de tipo factorial completo (FFD) para la síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.....	66
Tabla 4.4. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados mediante MLR para la respuesta de distancia interlaminar d_{001} obtenida de films de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido.....	67
Tabla 4.5. Segundo diseño de experimentos de tipo circunscrito central compuesto (CCC) para la síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido.....	71
Tabla 4.6. Datos experimentales del segundo diseño de experimento circunscrito central compuesto (CCC) para la optimización de síntesis de films nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.....	73
Tabla 4.7. Evaluación del modelo obtenido por PLSR (tras 4 PLS-componentes) para la optimización de síntesis de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido.....	74
Tabla 4.8. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados mediante PLSR (tras 4 PLS-componentes) para la optimización de síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.....	76
Tabla 4.9. Primer diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles (2^4) para la síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.....	88
Tabla 4.10. Datos experimentales del primer diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles (2^4) para la síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.....	89
Tabla 4.11. Evaluación del modelo por PLSR (tras 3 PLS-componentes) para la síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.....	90
Tabla 4.12. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados tras 3 PLS-componentes para la síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.....	91
Tabla 4.13. Segundo diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles describiendo las cuatro variables x para la síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.....	95

Tabla 4.14. Datos experimentales para segundo diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles (2^4) describiendo las cuatro variables x para la síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.....	96
Tabla 4.15. Evaluación del modelo de regresión PLSR (tras 4 componentes PLS) para síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.....	97
Tabla 4.16. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados mediante PLSR (tras 4 componentes) para films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión...	99
Tabla 4.17. Determinación de CI_{50} <i>in vitro</i> de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con carvacrol/timol aplicados sobre micelios de <i>Botrytis cinerea</i> al cabo de 7 días de contacto a 25 °C.....	106
Tabla 4.18. Variables a estudiar para el estudio de la cinética de liberación de carvacrol hacia simulador de alimento desde nanocompuestos de PEBD/MOM.....	110
Tabla 4.19. Resultado estadístico del diseño experimental generado por D–optimal usado para evaluar las variables que influyen en la liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento.....	111
Tabla 4.20. Datos experimentales del diseño D–optimal para el estudio de la cinética de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento a 18 °C.....	114
Tabla 4.21. Análisis de difusión y cinético para la liberación de carvacrol en simulador de alimento a 18 °C desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con 4 % de compatibilizante.....	115
Tabla 4.22. Evaluación del modelo obtenido por PLSR (tras 7 PLS-componentes) del diseño experimental D-optimal utilizado para estudiar la liberación de carvacrol hacia simulador de alimento desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.....	116
Tabla 4.23. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados mediante PLSR (tras 7 componentes) para el estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento.....	119
Tabla 4.24. Diseño D-optimal para el estudio de liberación de carvacrol hacia simulador de alimento desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.....	125
Tabla 4.25. Resultado estadístico del diseño experimental generado por D–optimal usado para evaluar las variables que influyen en la liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de ATP/MOM hacia simulador de alimento.....	126
Tabla 4.26. Estudio de homogeneidad de contenido de carvacrol en films nano/bionanocompuestos.....	127
Tabla 4.27. Datos experimentales del diseño D–optimal para el estudio de pérdida de carvacrol por volatilización desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.....	130
Tabla 4.28. Evaluación del modelo obtenido del diseño experimental D-optimal tras 8 PLS-componentes para el estudio de la pérdida de carvacrol por volatilización al ambiente desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.....	131
Tabla 4.29. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados tras 8 PLS-componentes para el estudio de pérdida de carvacrol en films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.....	135

Tabla 4.30. Resultados experimentales para el diseño D–optimal del estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.....	140
Tabla 4.31. Evaluación del modelo obtenido del diseño experimental D-optimal tras 6 PLS-componentes para el estudio de la pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.....	141
Tabla 4.32. Coeficientes de regresión normalizados (<i>b</i>) calculados tras 6 PLS-componentes para el estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.....	142
Tabla 4.33. Coeficientes de difusión <i>D</i> y energías de activación de difusión <i>E_a</i> para la liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con %Arcilla = 3,0 %m/m; %Compat. = 7,0 %m/m, y desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM con %Arcilla = 3,0 %m/m; %Plastif. = 30 %m/m.....	146
Tabla 4.34. Ensayo <i>in vivo</i> de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> inoculadas en frutillas por efecto de carvacrol cargado en nano/bionanocompuestos tras cinco días de tratamiento.....	150
Tabla 4.35. Determinación de CI ₅₀ de carvacrol sobre frutillas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> ...	151
Tabla 4.36. Resultados análisis sensorial de aceptación en frutillas tratadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol por contacto indirecto.....	152
Tabla 4.37. Ensayo <i>in vivo</i> de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> inoculadas en frutillas por acción en fase vapor de carvacrol/timol (50:50) cargado en nano/bionanocompuestos tras cinco días de tratamiento.....	155
Tabla 4.38. Determinación de CI ₅₀ total de carvacrol/timol (50:50) en films de nano/bionanocompuestos para la inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> inoculadas en frutillas.....	155
Tabla 4.39. Resultados análisis sensorial discriminativo triangular en frutillas tratadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol (50:50) por contacto indirecto.....	157
Tabla 4.40. Análisis de pérdida de masa de frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente, realizado por medio de ANOVA con test de comparación múltiple de Bonferroni ($\alpha = 5\%$).....	162
Tabla 4.41. Evaluación del cambio de color externo en frutillas empacadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.....	163
Tabla 4.42. Análisis de diferencia de color (ΔE^*_{ab}) en frutillas empacadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente. Análisis realizado por medio de ANOVA con test de comparación múltiple de Bonferroni ($\alpha = 0,1\%$).....	165
Tabla 4.43. Análisis de firmeza en frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente. Análisis mediante test múltiple de <i>t</i> de Student con significancia estadística determinada usando el método Holm-Sidak ($\alpha = 5\%$).....	166

ABREVIACIONES

%Arcilla	porcentaje de nanoarcilla en la formulación
%Comp.	porcentaje de compatibilizante en la formulación
%Plastif.	porcentaje de plastificante en la formulación
%m/m	porcentaje masa/masa
ΔE^*_{ab}	diferencia de color de acuerdo al espacio de color CIELAB
a^*	valor de –verde a +rojo en las coordenadas de cromaticidad de acuerdo al espacio de color CIELAB
AFM	Microscopía de fuerza atómica (<i>Atomic force microscopy</i>)
ANOVA	Análisis de varianza (<i>Analysis of variance</i>)
ASLT	Estudios de pruebas de vida útil (<i>Accelerated shelf life testing</i>)
ATP/MOM	almidón termoplastificado/montmorillonita orgánicamente modificada.
b	coeficiente de regresión
b^*	valor de –azul a +amarillo en las coordenadas de cromaticidad de acuerdo al espacio de color CIELAB
C^*	valor de croma métrica de acuerdo al espacio de color CIELAB
CCC	Diseño circunscrito central compuesto (<i>Central composite circumscribed design</i>)
CIELAB	modelo cromático CIE 1976 $L^* a^* b^*$
CI_{50}	concentración inhibitoria del 50 %
D	coeficiente de difusión
D_0	factor pre-exponencial de coeficiente de difusión
d_{001}	distancia interlaminar
DOE	Diseño de experimentos (<i>Design of experiments</i>)
DRX	Difracción de rayos X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
E	módulo de Young
E_a	energía de activación de difusión
EFSA	Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (<i>European Food Safety Authority</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (<i>Food and Drug Administration</i>)
FFD	Diseño factorial completo (<i>Full factorial design</i>)
G'	módulo de almacenamiento
G''	módulo de pérdida
G/A	proporción glicerina/agua
g.l.	grados de libertad
GRAS	reconocido como seguro (<i>generally recognized as safe</i>)
h	valor de ángulo de tono métrico de acuerdo al espacio de color CIELAB
k_1	constante de velocidad cinética total
k_d	constante de velocidad de difusión

L^*	valor de luminosidad de acuerdo al espacio de color CIELAB
m_t	cantidad de migrante que abandona el film a tiempo t
m_∞	cantidad de migrante que abandona el film en el equilibrio
$min.inh.$	mínimo efecto inhibitorio
$max.inh.$	máximo efecto inhibitorio
MLR	Regresión lineal múltiple (<i>Multiple linear regression</i>)
MOM	montmorillonita orgánicamente modificada
NIPALS	Cuadrados parciales mínimos iterativos no lineales (<i>Non-linear iterative partial least squares</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal components analysis</i>)
PDA	agar dextrosa de patata
PEBD/MOM	poli(etileno) de baja densidad/montmorillonita orgánicamente modificada.
PET	poli(etileno) tereftalato
PLSR	Regresión por cuadrados parciales mínimos (<i>Partial least squares regression</i>)
PRESS	suma de cuadrados de los residuales de predicción
q	flujo que se transfiere por unidad de tiempo y área
Q^2	bondad de predicción
R	constante de los gases ideales
R^2	bondad del modelo, coeficiente de determinación
RSM	Metodología superficie respuesta (<i>Response surface methodology</i>)
SS	suma de los cuadrados de la variación total (<i>sum of squares</i>)
SS_{resid}	suma de los cuadrados de la variación total de los residuales (<i>sum of squares of residuals</i>)
t_1	x -scores del componente 1
$T_{0.05}$	temperatura de descomposición del 5 %
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission electron microscopy</i>)
TGA	Análisis termogravimétrico (<i>Thermogravimetric analysis</i>)
T_m	temperatura de fusión
T_{mix}	temperatura de mezclado
t_{mix}	tiempo de mezclado
t_R	tiempo de retención
u_1	y -scores del componente 1
v_0	velocidad de liberación inicial
v_{mix}	velocidad de mezclado
w_1c_1	PLSR x -weights e y -weights (<i>loadings</i>) del componente 1
x	variable (variable independiente)
y	respuesta (variable dependiente)

CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN

1.1. Frutos frescos y berries en Chile

El sector alimentario es el segundo sector económico en generación de divisas en nuestro país, creciendo a razón de USD 1.000 millones por año, y duplicando el valor de sus exportaciones en los últimos 10 años [1]. La importancia de este sector productivo ha llevado a que desde el año 2008, el Gobierno de Chile se haya trazado como meta a mediano plazo posicionar a nuestro país como una “potencia agroalimentaria” a nivel mundial, y se ha clasificado al sector alimentario como un *cluster* estratégico para la investigación y el desarrollo [2, 3]. Dentro del sector alimentario, la producción de fruta fresca en Chile es actualmente el tercer mercado en importancia en ese sector económico, siendo nuestro país el primer exportador de fruta del hemisferio sur, incluso liderando el mercado mundial en exportación de uva de mesa y arándanos. La superficie frutícola nacional alcanza alrededor de las 300.000 hectáreas, abarcando desde la región de Atacama hasta Los Lagos. Este sector industrial produce aproximadamente 5 millones de toneladas de fruta, de las cuales se exportan 2,6 millones como fruta fresca principalmente a Norteamérica y Europa, generando más de USD 4.000 millones anualmente [4, 5].

Dentro del mercado de las frutas frescas, Chile es el principal exportador de berries del hemisferio sur, en volumen y valor, y el quinto en volumen exportado a nivel mundial. En la última década sus exportaciones han crecido sostenidamente, exportándose en el 2012 cerca de 140.000 toneladas de berries con un valor de USD 550 millones, incluyendo arándanos, frambuesas, frutillas y moras, entre otros. Los berries se han convertido en uno de los frutos más dinámicos del comercio mundial de alimentos, y se espera que el mercado continúe expandiéndose por el marcado aumento de su demanda a nivel mundial [6].

Se estima que entre un 20 – 40 % de los berries frescos se pierden en el período postcosecha, siendo causa de esto (a) factores biológicos: respiración, producción de etileno, deterioro fisiológico, deterioro patológico, daño mecánico, pérdida de agua; y (b) factores ambientales: temperatura, humedad relativa, composición atmosférica. Entre los berries cultivados en nuestro país, la frutilla (*Fragaria × ananassa*) es un fruto no climatérico pero de alta tasa respiratoria y que posee una muy delgada epidermis. Perteneciente al orden Rosales y a la familia de las

Rosáceas, posee una alta actividad fisiológica postcosecha, una gran fragilidad a las lesiones mecánicas, una alta pérdida de agua postcosecha, sumado a un alto deterioro por enfermedades patológicas, lo cual lo transforman en un fruto altamente perecible, que hace de su comercialización como fruto de alta calidad, un verdadero desafío [7, 8]. Las enfermedades sujetas a patógenos sufridas por este fruto son debidas principalmente a hongos: e.g. *Penicillium spp.*, *Mucor spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, pero es mayoritariamente *Botrytis cinerea* (“pudrición gris”) el principal agente causal en las enfermedades de pre y postcosecha en frutillas [9, 10]. *Botrytis cinerea* es el causante de enfermedades en más de 200 especies diferentes de plantas frutales, y es el patógeno más importante en el decaimiento de las frutillas (ver figura 1.1) resultando en deterioro de su calidad y altos porcentajes de pérdida. Este hongo infecta las hojas y las flores de la planta para luego pudrir el fruto cuando comienza a madurar en la precosecha, y también afectándolo en la postcosecha durante el almacenamiento [11–13].



Figura 1.1. Pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en *Fragaria × ananassa*. [14]

Hasta el momento no existen cultivos de frutillas resistentes a este patógeno, y las estrategias para reducir las pérdidas postcosecha se basan en disminuir la maduración y senescencia del fruto, su deshidratación, y evitar el ataque microbiano. Estas estrategias se aplican principalmente a base del rápido enfriamiento postcosecha y su almacenamiento a bajas temperaturas (0 – 4 °C). Con el fin de disminuir las enfermedades postcosechas también se han utilizado y estudiado diversos métodos como: (a) uso de fungicidas químicos sintéticos [15], (b) empaques con atmósferas modificadas bajas en O₂ y altas en CO₂ [16], (c) uso de agentes antimicrobianos biológicos como *Cryptococcus laurentii* [17], *Candida oleophila* y

Aureobasidium pullulans [18] entre otros, y (d) uso de agentes antimicrobianos químicos como nitritos, propionatos, sorbatos, benzoatos, parabenos, sulfitos, etc [19].

El uso de agentes antimicrobianos para combatir las infecciones postcosecha en frutos frescos ha sido una estrategia ampliamente utilizada para prolongar su vida útil. La tendencia mundial a consumir alimentos naturales de calidad y con mayores márgenes de seguridad, sumado a la presión por parte de los consumidores y los mercados por utilizar menos aditivos sintéticos y más productos naturales o “verdes”, ha llevado a que la investigación y uso de antimicrobianos “naturales” esté en constante crecimiento a fin de poder sustituir con la misma eficacia antimicrobianos y conservadores sintéticos en alimentos. De entre los antimicrobianos naturales, los aceites esenciales y sus derivados extraídos de plantas y especias han despertado gran interés como potenciales agentes antimicrobianos por su estudiada efectividad contra una amplia gama de agentes patógenos alimentarios, como también por su probada inocuidad y seguridad para el consumidor.

1.2. Aceites esenciales de plantas y especias

Los aceites esenciales han sido utilizados ampliamente a lo largo de los tiempos como agentes bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarios, insecticidas y en aplicaciones medicinales, farmacéuticas, cosméticas y alimentarias. Son líquidos aromáticos volátiles de tipo oleoso resultado del producto final del metabolismo secundario de las plantas, y son obtenidos de diferentes partes de éstas (flores, semillas, hojas, tallos, frutas, raíces, etc.) por fermentación, extracción o destilación. La composición química de los aceites esenciales se basa principalmente en compuestos de tipo terpénico, terpenoides, compuestos aromáticos de tipo fenólico y componentes alifáticos con diferentes actividades y composición, ya que pueden estar presentes en gran cantidad en los aceites, como también en trazas [20]. En la tabla 1.1 se muestran algunos componentes de aceites esenciales con actividad antimicrobiana presentes naturalmente en plantas.

Tabla 1.1. Principales componentes de aceites esenciales con propiedades antimicrobianas presentes en plantas [21].

Planta	Nombre científico	Principales componentes	Cantidad
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalool	26 %
		E-2-decanal	20 %
Canela	<i>Cinnamomum zaylandicum</i>	<i>trans</i> -cinamaldehído	65 %
Menta	<i>Menta piperita</i>	Mentol	59 %
		Mentona	19 %
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Trazas-80 %
		Timol	Trazas-64 %
		γ -Terpineno	2-52 %
		p-Cimeno	Trazas-52 %
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno	2-25 %
		Acetato de bornil	0-17 %
		Canfor	2-14 %
		1,8-cineolo	3-89 %
		Canfor	6-15 %
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>	α -pineno	4-5 %
		β -pineno	2-10 %
		1,8-cineolo	6-14 %
		α -tujona	20-42 %
		Eugenol	75-85 %
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Acetato de eugenilo	8-15 %
		Timol	10-64 %
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Carvacrol	2-11 %
		γ -Terpineno	2-31 %
		p-Cimeno	10-56 %

Tanto los aceites esenciales como sus constituyentes principales han demostrado poseer un amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo activos tanto en bacterias, levaduras y hongos que recurrentemente producen contaminación en alimentos. Diversos reportes demuestran esta actividad antimicrobiana tanto *in vitro* como en alimentos: *e.g.* efecto antibacteriano de aceite esencial de orégano sobre *Escherichia coli* en salchichas frescas [22], efecto antifúngico de aceite esencial del tomillo contra *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* [23], efecto antimicrobiano de aceite esencial de orégano en lechugas y zanahorias [24].

Por la gran variedad de componentes en los aceites esenciales y su amplio espectro antimicrobiano, se cree que hay varios mecanismos de acción implícitos (ver figura 1.2). Su

lipoafinidad les permite atravesar membranas, llegar hasta las mitocondrias, haciendo todas estas paredes más permeables y produciendo ruptura de membranas citoplasmáticas bacterianas y alterando las bombas de protones y los transportes activos, y afectando la función respiratoria microbiana y la producción de toxinas, enzimas o ácidos [25, 26].

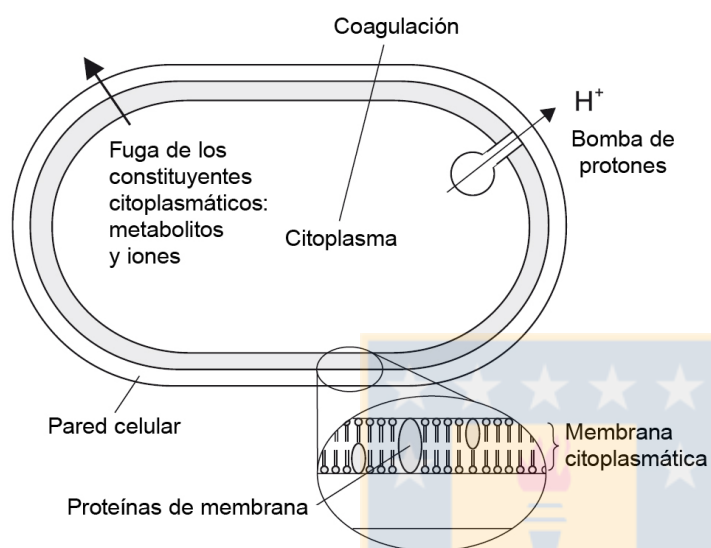


Figura 1.2. Mecanismos de acción de los componentes de aceites esenciales en la célula microbiana [21].

Los principios activos que componen los aceites esenciales poseen generalmente una alta presión de vapor por lo que se volatilizan fácilmente, pudiendo también utilizarse esta fase vapor como agente antimicrobiano. Diversos autores han demostrado los efectos antimicrobianos de aceites esenciales y sus componentes al ser utilizados en fase vapor tanto *in vitro* como en alimentos: *e.g.* vapores de aceites esenciales de cítricos sobre *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* y *Alternaria alternata* [27], diversos vapores de aceites esenciales sobre *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* [28], vapores de carvacrol y cinamaldehído sobre *Penicillium notatum* [29].

Se han detectado diferencias entre las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de aceites esenciales contra patógenos alimentarios cuando son utilizados por contacto directo (forma líquida) y cuando son utilizados en fases vapor. En fase de vapor, los componentes volátiles presentes en el aceite esencial tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, se encuentran en equilibrio de fase y por tanto disponibles en la microatmósfera formada; a diferencia de cuando se usan los

aceites esenciales por contacto directo, ya que su efectividad antimicrobiana dependerá de la polaridad del medio en el que están estos compuestos, por lo que las CIM pueden aumentar si el mayor poder antimicrobiano está en compuestos que no son afines al medio, y por tanto están menos disponibles [21]. Además, existe evidencia de que al ser usados en alimentos, los aceites esenciales y sus componentes necesitan mayores concentraciones para lograr los mismo efectos *in vitro*. Esto puede deberse a la mayor disponibilidad de nutrientes (grasas, proteínas, agua, antioxidantes) en los alimentos – comparado con los medios de cultivo – que le permitirían a los microorganismos reparar más rápidamente sus membranas dañadas. También se cree que los aceites esenciales más liposolubles podrían estar menos disponibles para microorganismos que estén en la fase acuosa del alimento [27]. Las condiciones extrínsecas (temperatura, envases al vacío/gas/aire) también pueden influenciar en la sensibilidad de los microorganismos. La susceptibilidad de los microorganismos también parece aumentar al disminuir el pH, ya que aumentaría así la lipoafinidad de los componentes fenólicos de los aceites esenciales, por estar en su forma no disociada, y se disolvería mejor en los lípidos de las membranas celulares de los microorganismos [21]. La estructura física del alimento también limitaría la acción antimicrobiana de estos compuestos; matrices más gelatinosas disminuirían sus efectos a diferencia de las matrices acuosas, a causa de las diferentes difusiones de los aceites esenciales en ambas matrices. Cuando hay poco oxígeno disponible hay menos oxidación en los aceites esenciales, y además el metabolismo anaeróbico de las células los hace más sensible a estos agentes, siendo esta la razón por la que el uso de orégano y vacío ha mostrado buenos resultados en inhibición microbiana [30]. El uso de vapores generados por aceites esenciales tiene mayor efecto sobre hongos y levaduras en comparación con bacterias, ya que por su crecimiento superficial son más susceptibles a los vapores, y por tanto requieren menores concentraciones para lograrse el efecto antifúngico. Todo esto apunta a que el uso de vapores de aceites esenciales o de sus componentes – en comparación con la aplicación directa – posee ventajas considerables en efectividad antimicrobiana y en una menor alteración de las características físico-organolépticas de los alimentos [31].

En células eucariontas los aceites esenciales y sus componentes han demostrado ser no genotóxicos, y la mayoría de estos poseen propiedades antioxidantes [32]. Además los aceites esenciales y sus componentes han demostrado estar exentos de carcinogenicidad, y la gran mayoría de ellos no han mostrado inducir mutagenicidad nuclear en ningún tipo de organismo,

es más, la mayoría de los estudios muestran que los aceites esenciales tienen un efecto anti-mutagénico y anti-carcinógeno debido a que inhiben la penetración de mutágenos a las células por sus propiedades antioxidantes [33, 34]. A concentraciones de 0,1 mM de timol y carvacrol no se reportan efectos citotóxicos a nivel de ruptura de ADN en linfocitos humanos [35]. Gran parte de los componentes de aceites esenciales están catalogados como aditivos alimentarios tipo GRAS “*generally recognized as safe*” (reconocidos como seguros) por la FDA en EE.UU, y están incluidos en la lista A del Council of Europe. Este también es el caso de carvacrol y timol, que han llegado incluso a ser usados en la UE y EE.UU. como aditivos alimentarios, lo que avala su inocuidad al ser agregados en los alimentos en bajas dosis [36, 37]. El timol (5-metil-2-(1-metiletil)fenol) y el carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)fenol) (ver figura 1.3) son terpenoides de tipo fenólicos que componen mayoritariamente los aceites esenciales del tomillo (*Thymus vulgaris*) y el orégano (*Origanum vulgare*) alcanzando hasta concentraciones de hasta un 80 % en estos aceites [21].

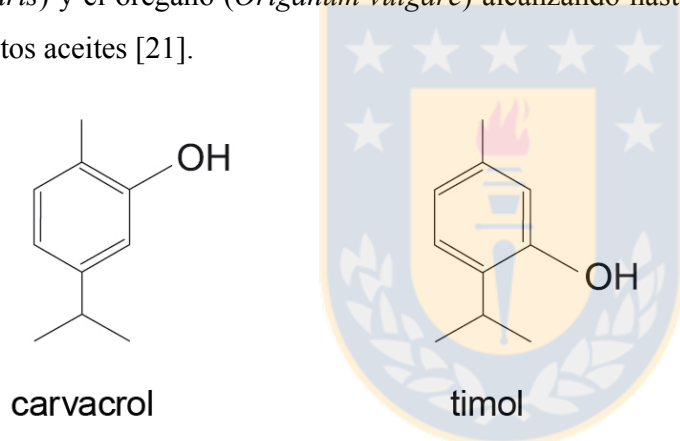


Figura 1.3. Estructura química de carvacrol y timol.

Ambos principios activos han mostrado un amplio espectro de actividad antimicrobiana *in vitro*: *e.g.* *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteria* entre otros, con CIM entre 0,05 – 5,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$ [21]. Además de su efecto antibacteriano, tanto carvacrol como timol han demostrado un potente efecto *in vitro* e *in vivo* contra hongos y levaduras que crecen comúnmente en alimentos: *e.g.* carvacrol sobre *Rhizopus spp.*, *Aspergillus spp.* y *Mucor spp.* [38], carvacrol y ácido cinámico en crecimiento microbiano en kiwis y melones [39], timol sobre *Penicillium citrinum* en quesos [40]. Los agentes patógenos más comunes que infectan los berries – entre ellos la frutilla – también han mostrado una clara susceptibilidad frente a diversos componentes de aceites

esenciales incluidos carvacrol y timol: *e.g.* aceite esencial de canela sobre *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en pimientos y tomates [41], aceite esencial de orégano sobre *Botrytis cinerea* en tomates [42], aceite esencial de tomillo sobre *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en frutillas [43], carvacrol sobre *Botrytis cinerea* en uva de mesa [44], timol, carvacrol, eugenol y mentol sobre *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus spp*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* entre otros [45].

Hay evidencia de efecto antimicrobiano sinérgico/aditivo entre componentes de aceites esenciales – entre ellos el carvacrol con timol – cuando se usan en conjunto. Esto podría deberse al complementar los diferentes mecanismos de acción antimicrobianos de cada compuesto, lo que permitiría disminuir la concentración efectiva de cada uno, y así lograr una reducción significativa de la cantidad de antimicrobiano a utilizar para alcanzar un mismo efecto inhibitorio, lo cual es ventajoso al momento de evitar posibles alteraciones organolépticas en los alimentos, pudiéndose así lograr un balance entre efectividad antimicrobiana y aceptabilidad sensorial del alimento [46–48].

Si bien es cierto, la efectividad de las fases de vapor de aceites esenciales y sus componentes usados como parte de atmósferas modificadas en empaques de alimentos se ha estudiado ampliamente, la mayoría de estos estudios se basan en introducir estos compuestos activos volátiles dentro del empaque como sachets o contenidos en materiales ajenos al empaque mismo: *e.g.* gasas impregnadas de eugenol y timol dentro de envases de uvas [49]; papel filtro impregnado con aceite esencial de orégano dentro de envases de carne [50]; gotas de aceite esencial de orégano introducido libremente al interior de empaques de carne de pollo [51]. Una alternativa más efectiva es fijar o introducir el principio activo en el material del envase, formando parte de la matriz misma del empaque, pudiendo incluso controlar la liberación de la droga hacia el interior del envase para producir el efecto antimicrobiano deseado, transformándose así *per se* en un envase activo con propiedades antifúngicas controladas.

1.3. Envases activos en alimentos

La función primordial de los empaques para alimentos es mantener la calidad funcional de estos, prolongar su vida útil y mantener sus cualidades organolépticas. La demanda de alimentos frescos y de mejor calidad por parte de los consumidores, sumado a las nuevas prácticas del

retail de extender la distribución de los alimentos en mercados globalizados más lejanos, han llevado a que en las últimas décadas se intensifique la investigación y el desarrollo de empaques para alimentos que cumplan con estas necesidades. Tradicionalmente los empaques han tenido por función dar soporte mecánico y proteger los alimentos de elementos externos (microorganismos, luz, oxígeno, olores, etc), tratando en lo posible que este material sea lo más inerte posible y tenga una mínima interacción con el alimento. Hoy en día la visión que se tiene en el desarrollo de nuevos envases para alimentos apunta a lo contrario. Uno de los mayores avances en las últimas décadas es el desarrollo de los llamados “envases activos” los cuales son definidos como aquellos sistemas en donde el envase o sus componentes interactúan con el alimento y/o su entorno para extender su vida útil [52]. Los envases activos prolongan la vida útil de los alimentos, mantienen su calidad nutricional, inhiben el crecimiento de agentes patógenos, y previenen y/o indican la migración de contaminantes asegurando así la inocuidad del alimento. Actualmente existe una amplia variedad de tipos de envases activos, de los cuales algunos se indican y describen en la tabla 1.2.

Dentro de la gran variedad de envases activos, los envases liberadores de agentes antimicrobianos han despertado gran interés en la investigación y se han desarrollado algunas variedades para este tipo de envases. Actualmente los envases activos antimicrobianos se clasifican en dos grandes categorías: los migratorios y los no migratorios, dependiendo si el agente antimicrobiano se libera o no hacia la superficie del alimento o hacia el espacio cabeza del envase para suprimir el crecimiento microbiano [53]. Los agentes antimicrobianos pueden estar incorporados en el empaque activo de diferentes formas: en sachets para la liberación vapores de la droga, *e.g.* sistemas generadores de vapores de etanol contra *Saccharomyces cerevisiae* en pasteles [54], directamente incluido en el material del empaque, *e.g.* imazalil en material plástico para pimientos contra *Alternaria spp.* y *Botrytis spp.* [55], adsorbido o inmovilizado en la superficie de éste, *e.g.* péptido antimicrobiano inmovilizado en film contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* entre otros [56], o que el empaque posea propiedades antimicrobianas *per se*: *e.g.* acción antimicrobiana de envases de quitosano [57]. Dentro de los agentes antimicrobianos más utilizados en estos tipos de empaques activos se encuentran los sorbatos, benzoatos, propionatos, parabenos, sulfitos, nitritos, alcoholes, peróxido de hidrógeno, dietil pirocarbonato, antibióticos y bactericidas entre otros [58].

Tabla 1.2. Ejemplos de actuales envases activos usados como empaque de alimentos [58].

Tipo de envase activo	Sustancias usadas y modo de acción	Aplicación
Absorbente de oxígeno	Sistemas enzimáticos: alcohol oxidasa-vapor etanol Sistemas químicos: sulfuro de hierro, carbonato ferroso	Café, té, chocolates, leche en polvo, galletas
Absorbente/emisor de CO ₂ Absorbente de humedad	Polvos de hierro-hidróxido de calcio Sílica gel, alcohol polivinílico	Carne, pescado, café Productos deshidratados o secos
Absorbente de etileno Emisor de etanol Liberador de antimicrobianos	Carbón activado, Kieselguhr Etanol encapsulado Sorbatos, benzoatos, propionatos, etanol, ozono	Paltas, kiwis Pan, pasteles, pescado Duraznos secos
Liberador de antioxidantes Absorbente de olores Antiempañado y antipegajoso Absorbente/regulador de luz	BHA, BHT, TBHQ, ácido ascórbico Bicarbonato, carbón activado Vinilo con orientación biaxial Agentes bloqueadores de UV, hidroxibenzofenona	Cereales Café, jugos Frutos frescos, quesos Pizza, leche
Monitoreo Permeable a gases/respirable	Indicadores de tiempo-temperatura Films microporosos	Pastas refrigeradas Ensaladas “listas-para-comer”

La legislación del uso de envases activos/envases inteligentes para alimentos en EE.UU. aún no tiene una regulación específica, pero actualmente se ciñe a la Framework Regulation (EC) 450/2009 que rige los materiales activos o inteligentes para uso en contacto con alimentos. Sin embargo, la FDA posee una lista de aditivos alimenticios que pueden ser utilizados como antimicrobianos en estos tipos de envases – donde se incluyen el carvacrol y el timol – los cuales deben cumplir con las especificaciones de asegurar un límite máximo de migración de antimicrobiano [59]. Por otra parte, la Comunidad Europea está también trabajando en una regulación específica para envases activos/envases inteligentes por medio de la EFSA, la cual regularía la evaluación de seguridad de estos envases y la lista de sustancias autorizadas [60]. Actualmente ya se ha reportado una gran variedad de trabajos en donde se incluyen compuestos GRAS en materiales de empaques, y entre estos compuestos se han incluido los aceites esenciales y sus derivados como el carvacrol y el timol: films de polipropileno con carvacrol y timol [61], films de polietileno de baja densidad con carvacrol [62], films de soya con aceites esenciales de tomillo y orégano [63].

La mayoría de los materiales para uso en alimentos están fabricados de materiales no totalmente reciclables, biodegradables y/o compostables, impactando el medioambiente al momento de desecharlos, lo cual muchas veces también es una barrera al momento de exportar alimentos a mercados más exigentes y con normativas medioambientales más estrictas. Así, el uso de polímeros de larga duración como material de empaque de corta aplicación no se justifica, esto por su resistencia a la biodegradación o su pobre reciclado debido a la contaminación por alimentos. Por otro lado, se necesita del consumo de combustibles fósiles no renovables para la producción de estos plásticos, por lo que el aumento de precios del petróleo y gas natural repercute en el mercado de los plásticos y por consecuencia en el de los alimentos, siendo necesario el desarrollo de materiales alternativos que mejoren sus propiedades de biodegradación, reciclado o compostado [64].

1.4. Nanocompuestos y bionanocompuestos

Existe una gran gama de polímeros sintéticos usados actualmente en empaque de alimentos, los cuales poseen propiedades mecánicas, térmicas, de permeabilidad y reológicas adecuadas para este uso. Entre ellos el polietileno es vastamente usado en este campo, el cual posee excelentes propiedades como material para empaque de alimentos, posee un bajo costo y es de gran versatilidad, pero siendo una gran desventaja su pobre biodegradación en el medio ambiente [65]. Por otro lado, biomateriales y fibras naturales son fuentes viables de materia prima como relleno de compósitos industriales o como material para empaque en la industria. Polímeros biodegradables como la policaprolactona [66], ácido poliláctico [67], polihidroxicanoatos [68], poliésteres alifáticos [69] han sido estudiados como material para potencial uso en empaque, y se encuentran disponibles comercialmente a relativo bajo costo. Estos polímeros naturales tienen la ventaja de ser biodegradables por lo que son una alternativa “verde” a la hora de evaluar reemplazos a los polímeros basados en derivados del petróleo. Sus desventajas como materiales de empaque son su alta permeabilidad a los gases y vapores, su menor firmeza, menor resistencia al agua y menor resistencia térmica con respecto a los polímeros clásicos usados en empaque [70].

La aplicación de nanotecnología en el campo de empaque de alimentos ha mostrado durante los últimos años prometedores resultados, pudiendo mejorar la calidad y seguridad de los alimentos.

Entre sus muchas aplicaciones está el mejoramiento de diversas propiedades de envases, como sus propiedades morfológicas, reológicas, térmicas, de barrera para diferentes gases, liberación controlada de principios activos, desarrollo de nanoaditivos y nanosensores, envases con actividad antibacteriana, etc. [71]. Dentro de este tipo de materiales, los nanocompuestos han despertado gran interés y se han proyectado como una alternativa seria en el campo de los empaques. Los nanocompuestos son materiales híbridos nanoestructurados compuestos de una matriz polimérica y un relleno inorgánico – comúnmente una arcilla – el cual tiene una de sus dimensiones en el rango nanométrico. Se desarrollaron a fines de los años 80 y fueron comercializados por Toyota, y ya a fines de los años 90 se comenzaron a desarrollar e investigar como potenciales materiales para ser usados como empaque para alimentos [72]. Las nanoarcillas usadas en estos materiales son estructuras laminares cristalinas (platelets) de silicatos de aluminio y magnesio (filosilicatos) con espesores de 1 nm y diámetros del rango de 30 a 2000 nm unidos por fuerzas de van der Waals. Se incluyen la mica, esmectita, vermiculita y clorita, y donde dentro del grupo de las esmectitas se encuentran la montmorillonita, nontronita, saponita y hectorita. Estos materiales poseen un gran radio superficie/volumen – de hasta incluso $750 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ – y son capaces de mejorar las propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad gaseosa en plásticos al formar redes o caminos tortuosos cuando son incorporados en una matriz polimérica [73].

La montmorillonita ($M_x(\text{Al}_{4-x}\text{Mg}_x)\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$) es una de las arcillas más utilizadas en la síntesis de nanocompuestos por su alta capacidad de intercambio iónico entre otras características, y estructuralmente consiste en placas, una capa octahédrica interior a base de hidróxidos de Al y Mg, entre dos capas tetrahédricas de silicatos. La capa intermedia de óxido posee carga negativas, por lo que estas láminas “sándwich” pueden interaccionar con cationes como el sodio, lo que le da a la montmorillonita su típico ordenamiento en láminas (ver figura 1.4).

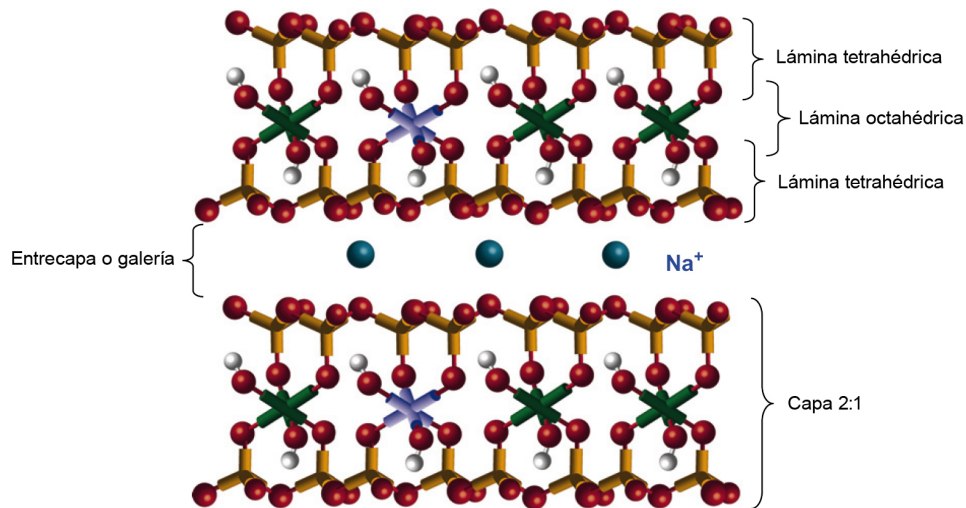


Figura 1.4. Estructura de la montmorillonita sódica [70].

Existen tres tipos de estructuras básicas (ver figura 1.5) que se reportan para nanocompuestos de tipo nanoarcilla/polímero: (a) tactoides o también llamados microcompuestos, en donde no hay formación de nanocompuestos al no haber una homogeneización de las fases, (b) intercaladas, en donde las cadenas de polímeros penetran entre las capas de la nanoarcilla pero manteniendo su forma tactoidal aunque con un incremento en la distancia interlamina de la nanoarcilla, y (c) exfoliadas, cuando las capas de nanoarcillas han sido delaminadas y separadas una de otra por una distancia mayor a la escala nanométrica y abandonando la forma tactoidal [74].

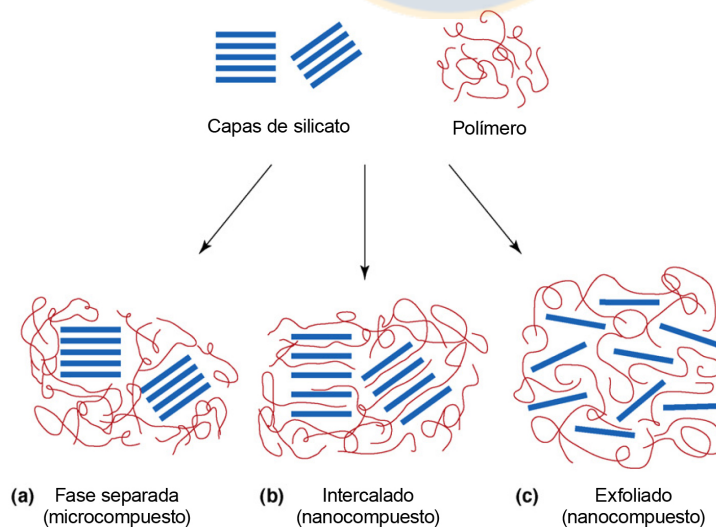


Figura 1.5. Diferentes tipos de estructuras que resultan de la interacción entre capas de silicatos y polímeros en la síntesis de nanocompuestos [74].

La intercalación y exfoliación del polímero entre las capas de la nanoarcilla es lo que confiere a estos materiales híbridos sus nobles propiedades de mayor resistencia mecánica, térmica, menos permeabilidad a gases, etc. La exfoliación completa es difícil de lograr al depender de muchos factores, entre los cuales están las diferencias de polaridad entre la fase polimérica muchas veces apolar y la fase inorgánica polar, además de diferencia de la afinidad termodinámica entre la arcilla y el polímero [75]. Esta afinidad puede mejorarse al modificar los iones interlaminares en la nanoarcilla. Por esto se ha tratado de compatibilizar las nanoarcillas modificándolas para incluir grupos funcionales afines con los polímeros, y así lograr mejores exfoliaciones. Los iones Na^+ presentes entre las galerías de la montmorillonita pueden hidratarse produciendo el hinchamiento de la arcilla. Estos iones pueden reemplazarse por cationes orgánicos, por ej: amonios cuaternarios con cadenas de hidrocarburos C14 o C18, formando las llamadas organoarcillas o arcillas orgánicamente modificadas. Estos cationes orgánicos pueden ser anfífilicos de acuerdo a su estructura, y actuar como surfactantes mejorando la compatibilidad con el polímero y aumentando el espacio interlaminar entre las capas de las arcillas [76]. La figura 1.6 muestra algunos de los surfactantes más comunes utilizados para modificar nanoarcillas transformándolas en arcillas orgánicamente modificadas.

Entre los métodos de síntesis de nanocompuestos más utilizados se encuentran: método de polimerización *in situ*, método en solución, método por mesofase, y método de mezclado en estado fundido. Este último es uno de los más utilizados por su economía, ausencia de solvente y flexibilidad en la formulación. Este método consiste en la mezcla a alta temperatura del polímero con la arcilla, así estando la matriz orgánica en su estado fundido sumado al movimiento de agitación y cizalla a alta velocidad se produce la intercalación de las fases [77]. Muchas veces para aumentar más la afinidad de la matriz orgánica con la nanoarcilla se han utilizado agentes “compatibilizantes”, que son polímeros modificados con anhídrido maléico principalmente, y que aumentan la afinidad entre ambas fases basado en la hidrofiliidad del compatibilizante y el largo de la cadena del modificador orgánico de la nanoarcilla, facilitando la delaminación y la intercalación del polímero en las galerías de la arcilla [78].

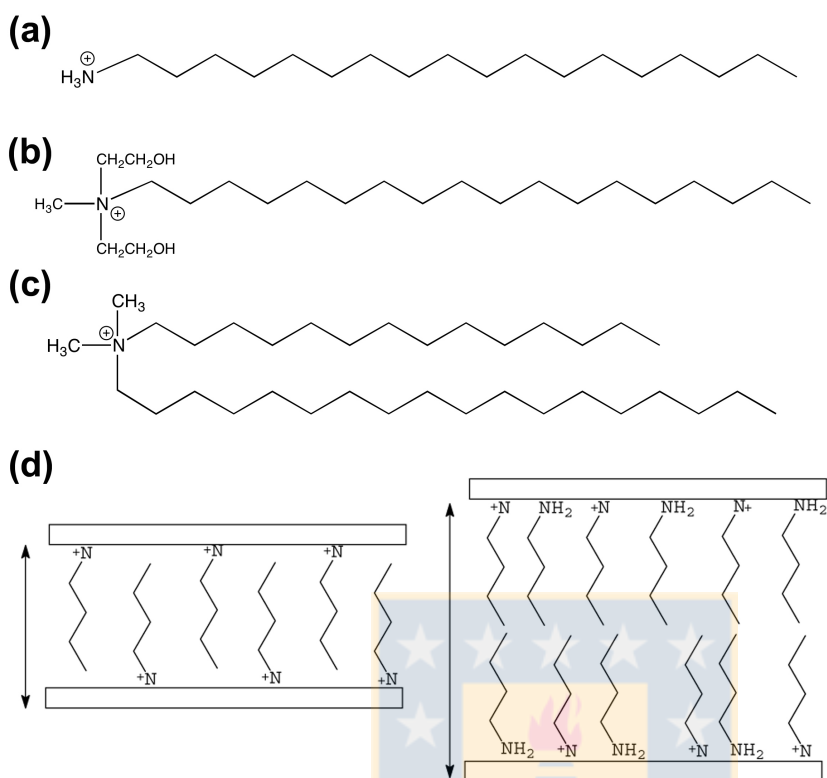


Figura 1.6. Estructura química de surfactantes empleados como organomodificadores en nanoarcillas (a) octadecilamina, (b) metil dihidroxietil octadecilamina, (c) dimetil dialquil(C14-C18) amina, (d) incremento del espacio interlamilar en arcillas con organomodificadores [72].

Se ha logrado producir nanocompuestos con buenos grados de exfoliación utilizando poli(etileno) de baja densidad (PEBD) y montmorillonita modificada junto a compatibilizantes a base de anhídrido maléico, utilizándose como films para su aplicación en alimentos incorporando principios activos tales como agentes antimicrobianos, lográndose a bajas concentraciones de montmorillonita mejorar las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera del polietileno [79]. Además, respecto a la desventaja de la pobre biodegradación del polietileno, se ha evidenciado que ésta aumenta al estar formando parte de nanocompuestos con nanoarcillas en comparación con la matriz polimérica sola, por lo que la síntesis de estos nanocompuestos, incluso utilizando polietileno, ya muestra una ventaja comparativa con respecto a los empaques tradicionales [80].

Dentro de los biopolímeros, el almidón es un material de gran potencial por su gran disponibilidad, bajo costo, total biodegradación en suelo y agua, y que además porque promueve

la biodegradación de los polímeros no-biodegradables a los cuales está unido [81]. Es un polímero semicristalino almacenado en gránulos como reserva en la mayoría de las plantas, y se compone de unidades repetitivas de amilosa lineal (1,4- α -D-glucopiranososa unida por uniones $\alpha(1-4)$) y amilopectina ramificada (1,4- α -D-glucopiranososa unida por uniones $\alpha(1-4)$ y ramificaciones $\alpha(1-6)$) [82]. La proporción de amilosa y amilopectina depende de la fuente de la cual se extrae el almidón. El almidón como potencial material termoplástico para empaque posee baja resistencia mecánica y una pobre protección contra el oxígeno y otros gases comparado con los materiales clásicos no biodegradables [83]. Existen numerosos trabajos en que a partir de almidón termoplastificado se producen nanocompuestos – llamados bionanocompuestos – utilizando montmorillonita como relleno, mejorando de esta forma las propiedades de permeabilidad al agua, tensión a la fuerza mecánica y aumento de la resistencia térmica [84, 85]. Además existen numerosos reportes en los cuales se incorporan principios activos antimicrobianos a formulaciones de almidón termoplastificados para su potencial uso como material de empaque: tiram en formulaciones de almidón/alginato/arcilla [86], ácido salicílico en fibras de mezclas de alginato/almidón [87], sorbato de potasio en films de nanocompuestos de almidón/arcilla [88] entre otros, por lo que el almidón termoplastificado a la forma de bionanocompuesto puede resultar en una alternativa viable para ser usado como material para empaques activos.

1.5. Liberación controlada de agentes antimicrobianos desde nanocompuestos

Uno de los factores que influyen en la efectividad de los films antimicrobianos es el perfil de liberación del principio activo: si es muy lenta su liberación, el crecimiento microbiano no se inhibe suficientemente, y si es muy rápida, la inhibición no se sostiene en el tiempo [89]. Las arcillas comúnmente forman parte de formulaciones farmacéuticas tanto como excipientes y como sustancias activas. Atapulgita, antiácidos a base de silicatos de magnesio, kaolín, bentonita y talco son comúnmente utilizados y muchos de ellos tienen en común la capacidad de retener, atrapar, disminuir la absorción y la biodisponibilidad de drogas [90] tanto por su gran capacidad de retención y por sus propiedades coloidales y de hinchamiento, como también debido a que los silicatos laminados tienen la propiedad de estabilizar suspensiones coloidales y emulsiones al modificar las interacciones entre las fases acuosa y oleosa, previniendo la

coalescencia debido a su alta relación superficie/masa y capacidad de adsorción, todo esto confiere a las nanoarcillas su potencial propiedad como transportadores o *carriers* [91]. La velocidad de liberación de la droga desde un nanocompuesto depende del tipo de polímero, tipo de arcilla, método de preparación del film, tamaño de la molécula a incorporar, propiedades químicas de la molécula, y de las condiciones del entorno entre otros factores [92]. Las arcillas modificadas pueden modelar la interacción del nanocompuesto con las drogas al cambiar el área/superficie, porosidad, carácter hidrofílico, tipo de cationes intercambiables, etc, y así poder modelar su liberación, la cual además es también retardada y regulada por la tortuosidad de la matriz polímero/arcilla al producirse una disminución en la permeabilidad y modificación de la cristalinidad del polímero [93]. Trabajos con montmorillonita y carvacrol han reflejado la alta interacción entre ambos lo que permite además que el principio activo quede protegido contra la degradación térmica del proceso de producción de los nanocompuestos (resistiendo incluso 210°C) y además permite que su liberación se retarde y pueda ser modelada [94]. Entendiendo como se controla la liberación de un principio activo en un material para empaque antimicrobiano, se puede diseñar de manera más efectiva un empaque activo con información del mecanismo de difusión, cinética de liberación, e interacciones entre los diferentes componentes de la matriz.

1.6. Antecedentes de la propuesta de tesis doctoral

A la luz de lo expuesto, se considera necesaria la investigación en el campo de los empaques de frutas frescas, ya que el mercado frutícola es considerado un sector clave en la economía de nuestro país. La exigencia de los mercados internacionales hace imperante el mejoramiento de la calidad de los productos frutícolas de exportación, reducir costos de producción y pérdidas postcosecha, y una forma de lograr esto es innovando en la tecnología de empaques para poder contribuir en el desarrollo de envases que puedan alargar la vida útil de frutos frescos. Los nanocompuestos presentan ventajas comparativas frente a los materiales clásicos usados tradicionalmente en envases y la inclusión de polímeros naturales en las formulaciones proporcionan una alternativa “verde” a un sector crítico en el impacto ambiental. Las ventajas que presentan las nanoarcillas, como la montmorillonita, al ser asequibles y mejorar las propiedades morfológicas, mecánicas y térmicas de polímeros que carecen de funcionalidades

para ser usados en empaques, hace de estos silicatos grandes alternativas para usarse en el modelaje de empaques activos a base de bionanocompuestos. La inclusión de agentes antimicrobianos GRAS de origen natural en empaques asegura la inocuidad del alimento, haciendo de los aceites esenciales y sus componentes principales, una alternativa segura para crear empaques activos antimicrobianos. Se han reportado numerosas investigación que apuntan a incorporar estos compuestos GRAS en materiales nanocompuestos, pero el estudio del control de liberación de estos compuestos en la matriz es aún un tópico en desarrollo por lo que se requiere conocer los mecanismo implícitos para poder controlar la liberación de estas drogas para así modelar empaques activos antimicrobianos con perfiles de liberación conocidos.



CAPÍTULO 2 – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Se puede prolongar la vida útil y conservar las propiedades organolépticas de frutillas frescas (*Fragaria × ananassa*) utilizando empaques activos a base de nanocompuestos con propiedades morfológicas, mecánicas, reológicas y térmicas óptimas, e incorporando compuestos GRAS con actividad antimicrobiana.

La incorporación de componentes de aceites esenciales: carvacrol y timol en los nanocompuestos, permitirían el uso de estos films como materiales de empaque antimicrobianos con acción por contacto directo con las frutas o por efecto de sus vapores, por ser compuestos volátiles al poseer altas presiones de vapor; y además podría controlarse la liberación de estos agentes variando parámetros como las concentraciones de nanoarcilla en las formulaciones, su modificación química, entre otros.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar nanocompuestos con actividad antimicrobiana para su potencial utilización en envases activos para frutillas (*Fragaria × ananassa*).

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar nanocompuestos en base a poli(etileno) de baja densidad y bionanocompuestos en base a almidón termoplastificado como matrices poliméricas, y montmorillonita modificada como relleno.
2. Incorporar aceites esenciales (carvacrol y timol) a los nano/bionanocompuestos como agentes antimicrobianos.
3. Caracterizar los nano/bionanocompuestos: propiedades morfológicas, reológicas, mecánicas, térmicas y control de liberación de principios activos.

4. Realizar ensayos antimicrobianos *in vitro* de nano/bionanocompuestos por contacto directo del film y por efecto de vapores de principio activo creando atmósferas modificadas sobre los principales agentes microbiológicos que afectan a las frutillas.
5. Realizar ensayos antimicrobianos *in vivo* de los nano/bionanocompuestos en frutillas (*Fragaria* × *ananassa*) por contacto directo del film y por efecto de vapores de principio activo creando atmósferas modificadas para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos.



CAPÍTULO 3 – MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

Poli(etileno) de baja densidad ($d = 0,925 \text{ g mL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, índice de fusión 25 g/10 min ($190 \text{ }^\circ\text{C/2,16 kg}$), temperatura de fusión $112 \text{ }^\circ\text{C}$) y almidón de maíz (amilopectina 73% y amilosa 27%) adquiridos en Sigma-Aldrich (EE.UU.) fueron usados sin tratamiento previo. Polybond[®] 3149 polietileno lineal de baja densidad-*co*-anhídrido maléico (índice de fusión $12 - 30 \text{ g/10 min}$ ($190 \text{ }^\circ\text{C/2,16 kg}$), temperatura de fusión $120 \text{ }^\circ\text{C}$) usado como compatibilizante, el cual fue proporcionado por Chemtura (Brasil) y usado sin tratamiento previo.

Nanoarcillas de montmorillonita orgánicamente modificadas: Nanomer[®] I.44P (montmorillonita modificada con $35 - 45 \%$ m/m dimetil dialquil (C14–C18) amina), Nanomer[®] I.30E (montmorillonita modificada con $25 - 30 \%$ m/m octadecilamina), Nanomer[®] I.34TCN (montmorillonita modificada con $25 - 30 \%$ m/m metil dihidroxietil octadecilamina) y Nanomer[®] montmorillonita sódica adquiridas en Sigma–Aldrich (Nanacor, EE.UU.) y usadas sin tratamiento previo.

Carvacrol $\geq 98 \%$, $d = 0,976 \text{ g cm}^{-3}$ y timol $99,5 \%$ fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (EE.UU.). Hexano grado HPLC y acetonitrilo grado HPLC adquiridos en J.T. Baker (EE.UU.). Agua desionizada obtenida mediante sistema de purificación LabTower[®] 30 EDI (Thermo Scientific, Alemania). Glicerina USP testing specifications (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Acido acético glacial grado analítico adquirido en Mallinckrodt (Irlanda). Alcohol etílico 98% p.a. y agar-agar adquiridos en Winkler (Chile). Agar de dextrosa de patata adquirido en Becton, Dickson & Co. (Francia).

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Síntesis de nano/bionanocompuestos

3.2.1.1. Síntesis de nanocompuestos de poli(etileno) de baja densidad (PEBD) con montmorillonita orgánicamente modificada (MOM)

La síntesis de nanocompuestos de poli(etileno) de baja densidad/montmorillonita orgánicamente modificada (PEBD/MOM) se llevó a cabo utilizando el método de procesado en estado fundido por medio de la mezcla de los reactivos en una mezcladora tipo Brabender (Proinco, Chile). La masa total de formulación utilizada fue de 30,00 g de mezcla total, utilizándose 2,0 % de glicerina en la formulación como agente desmoldante. En primer lugar se adiciona en la mezcladora el polímero y el compatibilizante a la temperatura y velocidad de mezcla definida, y al tener una pre-mezcla homogénea fundida de esta fase polimérica se agrega la nanoarcilla por el tiempo de mezcla definido. Luego de terminado el tiempo de mezclado, el nanocompuesto se prensa en caliente entre dos placas de acero inoxidable utilizando una prensa manual en caliente de doble plato (Proinco, Chile) por 3,0 minutos a la misma temperatura a la cual fue mezclada la formulación, obteniendo así un film de nanocompuesto de *ca.* 200 mm de diámetro, el cual se deja enfriar a temperatura ambiente.

3.2.1.2. Síntesis de bionanocompuestos de almidón de maíz termoplastificado (ATP) con montmorillonita orgánicamente modificada (MOM)

La síntesis de bionanocompuestos de almidón de maíz termoplastificado/montmorillonita orgánicamente modificada (ATP/MOM) se llevó a cabo por el método de extrusión empleado por Tang *et al.* [95] y McGlashan *et al.* [96] utilizando una extrusora de doble husillo de 400 mm de largo y 16 mm de diámetro con cuatro zonas de control de temperatura (Brox Instruments, Turquía). La masa total de formulación utilizada fue de 75,00 g. En primer lugar se prepara una pre-mezcla del almidón con el plastificante (glicerol/agua en proporciones dadas según el diseño de experimentos) de manera manual hasta homogeneidad completa y con posterior reposo para permitir el hinchamiento del almidón. A esta pre-mezcla se adiciona la nanoarcilla homogeneizando de manera manual, traspasando luego esta mezcla final a la extrusora a velocidad y temperatura definida. Al terminar de pasar la mezcla final por el dado de

la extrusora, ésta se prensa en caliente por 3,0 min a la misma temperatura de mezcla entre dos placas de acero inoxidable según el método descrito en la sección 3.2.1.1.

3.2.1.3. Síntesis de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con principios activos de aceites esenciales

La introducción de principios activos en los nanocompuestos de PEBD/MOM se llevó a cabo fundiendo primero la parte polimérica (PEBD y compatibilizante) como se describe en la sección 3.2.1.1, y paralelamente se mezcla de manera manual una cantidad definida de carvacrol/timol con la cantidad definida de nanoarcilla utilizando un mortero de porcelana hasta obtener una pasta homogénea, la cual se agrega a la fase polimérica ya fundida por el tiempo de mezcla definido. El prensado y enfriado se efectúa de la misma manera según el método descrito en la sección 3.2.1.1.

3.2.1.4. Síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM cargados con principios activos de aceites esenciales

La introducción de principios activos en los bionanocompuestos de ATP/MOM se llevó a cabo mezclando primero el almidón con el plastificante de manera manual hasta completa homogeneidad. Paralelamente se mezcla una masa definida de carvacrol/timol con la cantidad definida de nanoarcilla en un mortero de porcelana hasta obtener una pasta homogénea, la cual se agrega a la mezcla almidón/plastificante y se homogeniza de manera manual hasta obtener una mezcla final homogénea, la que luego se introduce en la extrusora a la velocidad de mezclado definida. El prensado y enfriado se efectúa de la misma manera según el método descrito en la sección 3.2.1.2.

3.2.2. Caracterización de nano/bionanocompuestos

3.2.2.1. Análisis morfológico de nano/bionanocompuestos

Las mediciones de difracción de rayos X (DRX) en los films de PEBD/MOM y ATP/MOM fue realizada en un difractómetro Bruker AXS D4 Endeavor (Alemania) usando radiación de Cu (40 kV, 20 mA) con una velocidad de barrido de 1° min^{-1} entre 2 y $30^\circ 2\theta$. La distancia interlamina (d_{001}) en los films de nanocompuestos se calculó a partir de los peaks de difracción

utilizando la Ley de Bragg: $\text{sen } \theta = n\lambda/2d$, en donde la distancia interlaminar d (expresada en nm) se calcula mediante el ángulo 2θ obtenido del peak, n es un número entero, y $\lambda = 0,154$ nm.

3.2.2.2. *Análisis térmicos de nano/bionanocompuestos*

Las propiedades térmicas de los nanocompuestos fueron determinadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la temperatura de fusión (T_m) usando un calorímetro DSC204 F1 Phoenix (Netzsch, Alemania), y por análisis termogravimétrico (TGA) se calcularon las temperaturas de descomposición ($T_{0.05}$, $T_{0.10}$ o $T_{0.50}$) usando un equipo TGA 209 F1 Iris Equipment (Netzsch, Alemania). La temperatura de fusión se determinó calentando *ca.* 10 – 15 mg de muestra de film de nano/bionanocompuesto bajo atmósfera inerte de N_2 (flujo de gas 20,0 mL min^{-1}) desde 25 a 200 °C a una velocidad de 10 °C min^{-1} , enfriando a una velocidad de 10 °C min^{-1} , y calentando nuevamente a una velocidad de 10 °C min^{-1} desde 25 a 200 °C. La temperatura de descomposición se determinó analizando la pérdida de masa en *ca.* 10 mg de muestra de film de nano/bionanocompuesto en un rango entre 20 – 600 °C (PEBD/MOM) y 20 – 500 °C (ATP/MOM), con una velocidad de calentamiento de 20 °C min^{-1} en aire.

3.2.2.3. *Análisis mecánicos y reológicos de nano/bionanocompuestos*

Las mediciones reológicas de módulo de pérdida (G'') y módulo de almacenamiento (G') fueron determinadas en un reómetro clásico ARES (TA Instruments, EE.UU.) equipado con platos paralelos de 8 mm de diámetro de plato y un gap de 1,0 mm. Las mediciones fueron hechas a 160 °C bajo atmósfera de N_2 (flujo de gas 25,0 L min^{-1}) y a una frecuencia dinámica de 0,5 Hz, en una amplitud de deformación de 4 % para asegurar que las medidas fueran realizadas en un rango reológico lineal. Las mediciones del módulo de Young (E) fueron realizadas según la norma ASTM D638 con un rango de estiramiento de 1,5 mm min^{-1} , llevadas a cabo a temperatura ambiente en un equipo GABO Eplexor Qualimeter (Alemania), siendo todas las mediciones hechas en triplicado.

3.2.2.4. *Análisis de microscopía: AFM y TEM*

Para analizar la topografía superficial de los films de nanocompuestos se realizaron fotografías por microscopía de fuerza atómica (AFM). Las imágenes de AFM fueron obtenidas usando un

microscopio de AFM Digital Instrument Nanoscope[®] IIIa series (Veeco, EE.UU.) empleando el método Tapping Mode[®] a una velocidad de escaneo de $0,02 \mu\text{m s}^{-1}$, un tamaño de escaneo de $1,5 \mu\text{m}$ and una escala eje-z de 200 nm div^{-1} . Las muestras de film fueron cortadas en trozos cuadrados de $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ y puestas en un scanner de AFM para su medición.

Para verificar los niveles de intercalación y exfoliación de los nano/bionanocompuestos se realizaron microfotografías por microscopía de transmisión electrónica (TEM). Estas se tomaron utilizando un microscopio TEM JEM 1200EX-II (Jeol, EE.UU.) con una aceleración de volataje de 100 keV . Las fotografías fueron tomadas con una Cámara Gatan modelo 782 (EE.UU.). Los films de polímeros fueron incluidos en araldita y polimerizados por 48 h a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Se hicieron cortes de aproximadamente 50 nm con un ultramicrotomo modelo Sorvall MT2-B (Dupont Instruments, EE.UU.).

3.2.2.5. *Cuantificación de principios activos de aceites esenciales en nano/bionanocompuestos*

La cuantificación de carvacrol y timol en films de nano/bionanocompuestos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección de fluorescencia. El equipo utilizado constó de un autosampler YL9150, un degasificador YL9101, una bomba cuaternaria YL9110, un compartimiento de columna YL9131 (YL Instruments, Korea) y un detector de fluorescencia FLD G1321A (Agilent, EE.UU.) operando a longitudes de onda de 274 y 590 nm (excitación y emisión respectivamente) según el método empleado por Viñas *et al.* [97]. Para la cuantificación de carvacrol solo, se utilizó una fase móvil isocrática compuesta de acetonitrilo:agua (60:40) con flujo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, utilizando una columna LiChrospher[®] 100 RP₁₈ de dimensiones $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ (Agilent Technologies, EE.UU.); y para la cuantificación de la mezcla carvacrol/timol se utilizó como fase móvil acetonitrilo:agua (50:50) con flujo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, y una columna Kromasil[®] 100-5C₁₈ de dimensiones $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ (AkzoNobel, Suecia). El volumen de inyección utilizado fue de $10 \mu\text{L}$. La cuantificación de carvacrol y timol en los extractos se calculó utilizando curvas de calibración de ambos compuestos en el rango lineal.

3.2.2.6. *Análisis de homogeneidad de contenido de carvacrol en nano/bionanocompuestos*

Para determinar la homogeneidad de contenido de carvacrol en los nano/bionanocompuestos se procedió a dividir en ocho zonas el film de nano/bionanocompuesto cargado con carvacrol tras

su prensado y enfriamiento, tomándose de cada zona una muestra por triplicado de *c.a.* 100 mg y sometiendo a extracción con 10,0 mL de hexano con agitación mecánica por 1 hora a 200 rpm en un agitador mecánico MaxQ 2506 (Thermo Scientific, EE.UU.). La cuantificación de carvacrol se llevó a cabo mediante HPLC según el procedimiento descrito en la sección 3.2.2.5. Para determinar si existe homogeneidad de contenido de carvacrol a lo largo del film de nano/bionanocompuestos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con una significancia estadística de $p < 0,05$ para comparar las concentraciones en las diferentes áreas de muestreo.

3.2.3. Optimización de la formulación y las condiciones de proceso para la síntesis de nano/bionanocompuestos

Para evaluar cómo las principales variables presentes en la formulación y en las condiciones de proceso de la síntesis de nano/bionanocompuestos influyen y modelan las propiedades de material de empaque de estos films, se complementaron diferentes técnicas quimiométricas para llevar a cabo los experimentos. Como estrategia se generaron diseños de experimentos factoriales completos y centrales compuestos para poder determinar si las variables evaluadas impactan de manera significativa en las propiedades morfológicas, mecánicas, térmicas y reológicas de los films de nano/bionanocompuestos, y si existen interacciones entre estas variables.

Para cada tipo de nanocompuesto (PEBD/MOM y ATP/MOM) se hicieron dos estudios de variables mediante diseño de experimentos, un primer estudio preliminar de *screening*, y un segundo estudio para definir y optimizar las variables de formulación y de proceso que se usarían para sintetizar los nano/bionanocompuestos utilizados en los estudios *in vitro* e *in vivo* posteriores.

A partir de las respuestas medidas en los experimentos hechos mediante estos diseños de experimentos, se obtuvieron las formulaciones y condiciones de proceso óptimas mediante técnicas quimiométricas de tratamiento de datos, con las cuales se generaron modelos matemáticos usando regresión lineal múltiple (MLR) o regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR). A partir de este modelamiento matemático que relaciona variables con respuestas medidas, se obtuvieron mapas superficie respuesta mediante metodología superficie respuesta (RSM) para conocer como se comporta el sistema en el área experimental estudiada, y

que combinación de variables sirven para definir las formulaciones de films óptimas. Se utilizó el método SIMPLEX para definir las respuestas óptimas del diseño experimental.

3.2.4. Estudio *in vitro* del efecto antifúngico de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol y timol sobre *Botrytis cinerea*.

Se evaluó el efecto antifúngico *in vitro* de carvacrol y timol cargado en films de nanocompuestos, utilizándose PEBD/MOM como modelo de film, y utilizándose *Botrytis cinerea* como agente patógeno. Se determinó este efecto antifúngico midiendo la concentración inhibitoria del cincuenta por ciento (IC_{50}) a través del crecimiento radial de micelios de *Botrytis cinerea* en agar dextrosa de patata (PDA) en contacto directo e indirecto con films de nanocompuestos. La concentración inhibitoria (CI_{50}), se define como la concentración x que provoca la mitad de la respuesta y entre el máximo efecto inhibitorio ($max.inh.$) y el mínimo efecto inhibitorio ($min.inh.$) de una droga sobre un organismo, y está dada por la ecuación (1), la cual sigue una forma sigmoidea simétrica de respuesta [98].

$$y = \frac{max.inh. + (min.inh - max.inh)}{1 + 10^{(x - log CI_{50})}} \quad (1)$$

Para esto se sintetizaron films de nanocompuestos de PEBD/MOM con diferentes concentraciones crecientes de carvacrol y timol que fueron desde 0,1 a 10 %m/m de principio activo en la formulación total. Cada formulación fue evaluada en triplicado.

Se incubó por tres semanas *Botrytis cinerea* aislada de frutillas a 25 °C hasta la formación de micelios, de donde se tomaron trozos circulares de 10 mm de diámetro de este agar con micelios y se depositaron en el centro de placas de Petri con PDA. Alrededor de esta siembra de micelios se depositaron cortes de films de nanocompuestos cargados con droga de manera de evaluar la inhibición del crecimiento micelial por efecto directo e indirecto.

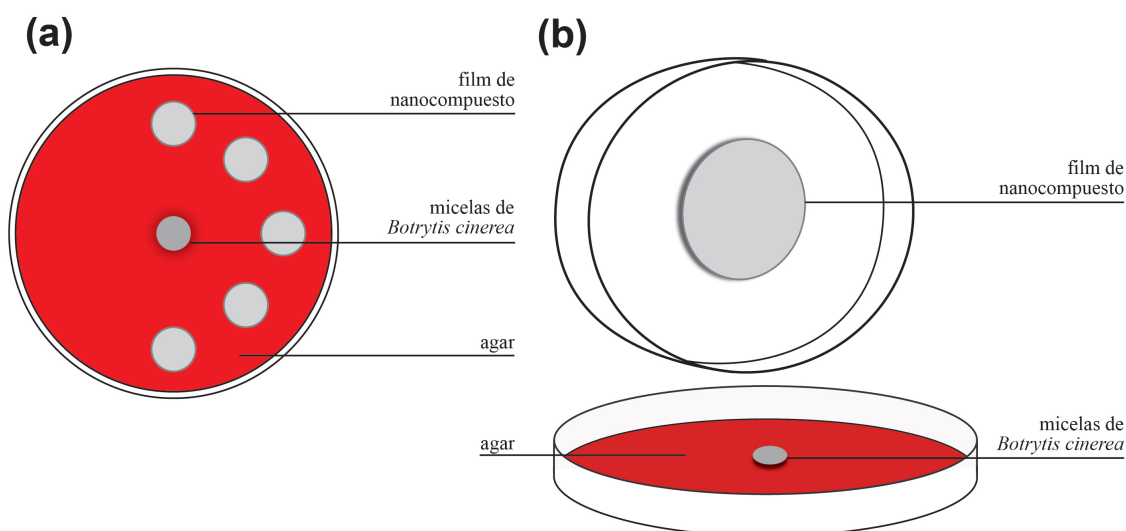


Figura 3.1. Ensayo *in vitro* del efecto antifúngico de films de nanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre micelios de *Botrytis cinerea*: (a) por contacto directo con los films, y (b) por contacto indirecto con los films.

Para la evaluación del efecto antifúngico por contacto directo, se procedió a depositar cinco cortes circulares de films de nanocompuestos cargados con droga de 10 mm de diámetro en el agar (*ca.* 1,35 mm de espesor) los cuales se colocaron hacia un lado del trozo de inóculo micelial a *ca.* 30 mm de distancia radial como se muestra en la figura 3.1a. Para el caso de la evaluación del efecto inhibitorio por contacto indirecto con los films, se fijó a la parte interior de la tapa superior de la placa de Petri un trozo redondo de film de nanocompuesto de 70 mm de diámetro (*ca.* 1,35 mm de espesor) como se muestra en la figura 3.1b. Tras fijar los trozos de film, las placas se taparon y sellaron con parafilm incubándose a 25 °C por 7 días, midiéndose diariamente la distancia de avance de los micelios en el agar desde el centro hacia la periferia. En el caso de la prueba por contacto directo, se midió el radio de crecimiento hacia el lado donde se situaron los films. La CI_{50} de carga de carvacrol y timol en las formulaciones de films se calculó midiendo el radio de crecimiento de los micelios de *Botrytis* al 7° día de incubación, y aplicando un ajuste sigmoideal de los datos según la ecuación (1).

3.2.5. Estudio del control de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos

El estudio de liberación de principios activos desde nanocompuestos de PEBD/MOM y bionanocompuestos de ATP/MOM se realizó tomando el carvacrol como droga modelo. Esta liberación se midió de dos formas: (a) liberación de principio activo desde el nano/bionanocompuesto hacia un simulador de alimento por difusión, y (b) pérdida por volatilización del principio activo hacia el ambiente circundante desde los nano/bionanocompuestos. Los estudios de perfil de liberación se llevaron a cabo evaluando como diversas formulaciones de nano/bionanocompuestos influenciaban estos perfiles. Esto se hizo mediante diseño de experimento con calibración de variables y respuestas por regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR).

3.2.5.1. Estudio del control de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia simulador de alimento

Un trozo cuadrado de 10 x 10 mm de film de nano/bionanocompuesto cargado con carvacrol recién elaborado (*ca.* 100 mg) se puso en contacto con 15,0 mL de agua destilada con 3 % de ácido acético como simulador de alimento de fruta fresca ácida [99] en un frasco de vidrio hermético y dejándose quieto a temperatura ambiente (18 ± 2 °C) por 60 días. Previamente se midió el espesor de los films con un micrómetro externo de $0 - 25 \pm 0,01$ mm de precisión (Redline Mechanics, EE.UU.) dando como espesor promedio de los films $1,34 \pm 0,01$ mm para PEBD/MOM y $1,77 \pm 0,12$ mm para ATP/MOM.

Tras suave homogenización se tomaron alícuotas de 1,0 mL en los intervalos de tiempo de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 días, reponiéndose en cada muestreo el volumen extraído con 1,0 mL del simulador de alimento nuevo. La concentración de carvacrol en el film a tiempo inicial cero se determinó después del prensado y enfriamiento del film tras su síntesis tomando una muestra de *ca.* 100 mg de nano/bionanocompuesto la cual se extrajo con 10,0 mL de hexano bajo agitación mecánica por 1 hora a 200 rpm. Las concentraciones de carvacrol en los diferentes extractos y muestreos se midieron por HPLC según lo indicado en la sección 3.2.2.5.

3.2.5.2. Estudio del control de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia el ambiente circundante

Para el estudio de pérdida de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia el ambiente circundante se dejó un trozo de *ca.* 100 mm x 20 mm de film de nano/bionanocompuesto recién elaborado a temperatura ambiente (18 ± 2 °C) y humedad relativa entre 65 – 70 % por 60 días. Los espesores de los films fueron de $1,36 \pm 0,04$ mm para films de PEBD/MOM y de $1,95 \pm 0,26$ mm para films de ATP/MOM. En intervalos de tiempo de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 días, se recortaron *ca.* 100 mg desde los bordes del film, los cuales se sometieron a extracción con 10,0 mL de hexano con agitación mecánica por 1 hora a 200 rpm según sección 3.2.2.6. La concentración de carvacrol en el film a tiempo inicial se determinó después del prensado y enfriamiento del film tras su síntesis tomando una muestra de *ca.* 100 mg y extrayendo el carvacrol según el procedimiento previamente descrito. Las concentraciones de carvacrol remanente en las muestras de film se midieron por HPLC según lo indicado en la sección 3.2.2.5.

3.2.6. Efecto de la temperatura en la liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos

Se estudió la influencia de la temperatura en la liberación de carvacrol desde nanocompuestos de PEBD/MOM y bionanocompuestos de ATP/MOM, midiéndose de dos formas: (a) efecto de la temperatura en la liberación de principio activo desde el nano/bionanocompuesto hacia simulador de alimento por difusión, y (b) efecto de la temperatura en la pérdida de principio activo desde el nano/bionanocompuesto al ambiente circundante por volatilización.

3.2.6.1. Efecto de la temperatura en el perfil de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia simulador de alimento

Se estudió el efecto de la temperatura en la liberación de carvacrol comparando su liberación desde nano/bionanocompuestos hacia agua destilada con 3 % de ácido acético como simulador de alimento a temperatura ambiente y bajo refrigeración (18 y 4 °C respectivamente) como se indica en la sección 3.2.5.1. Las concentraciones de carvacrol en los diferentes muestreos se midieron por HPLC según lo indicado en la sección 3.2.2.5.

3.2.6.2. Efecto de la temperatura en el perfil de liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos hacia el ambiente circundante

Se estudió el efecto de la temperatura en la pérdida de carvacrol por volatilización al ambiente dejando los films de nano/bionanocompuestos a temperatura ambiente, bajo refrigeración y bajo congelación (18, 4 y -18 °C respectivamente) siguiéndose el procedimiento de toma de muestra descrito en la sección 3.2.5.2. Las concentraciones de carvacrol en los diferentes extractos se midieron por HPLC según lo indicado en la sección 3.2.2.5.

3.2.7. Estudio *in vivo* del efecto antifúngico de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre frutillas (*Fragaria* × *ananassa*) inoculadas con *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*.

El efecto antifúngico *in vivo* de los films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol fueron evaluados sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* o *Rhizopus stolonifer*. Este efecto se evaluó por contacto directo de los films con las frutillas (ver figura 3.2a) y por contacto indirecto del film con las frutillas (ver figura 3.2b).

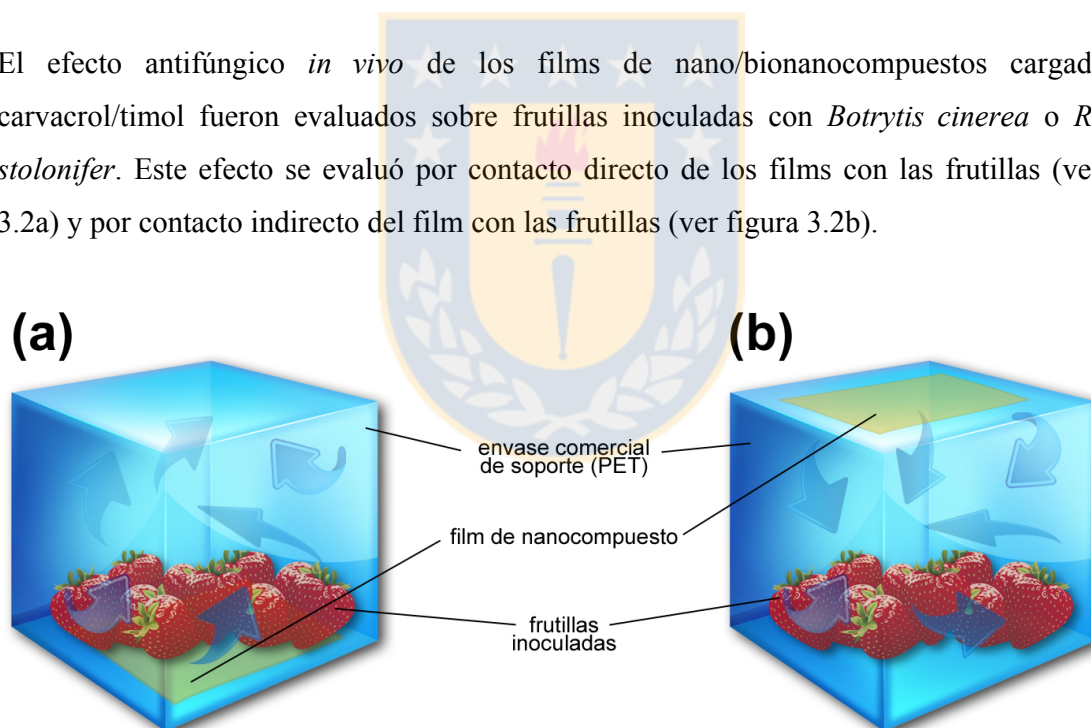


Figura 3.2. Esquema del ensayo *in vivo* del efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos cargados con principios activos derivados de aceites esenciales sobre frutillas inoculadas con hongos. (a) ensayos por contacto con el film, y (b) ensayos por contacto indirecto con el film mediante vapores de principios activos en el espacio cabeza.

El sistema de prueba que se utilizó constó de un envase soporte, el cual fue un envase comercial clásico de PET reciclado, transparente, de 340 cm³ de volumen interno, cuyo interior se dividió

en cuatro zonas utilizando una mica como separador para aislar cada frutilla dentro del envase y así evitar el contacto físico directo entre ellas durante el ensayo (ver figura 3.3).

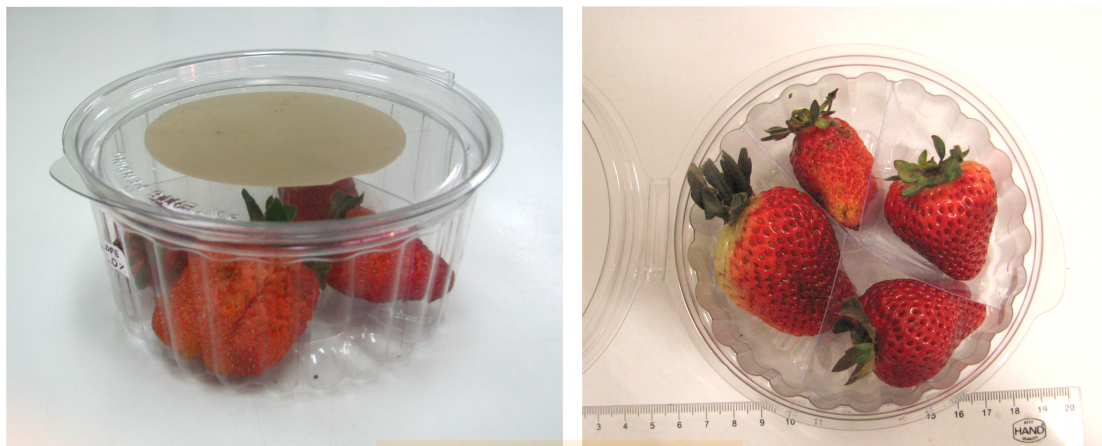


Figura 3.3. Modelos de prueba para ensayos *in vivo* de films de nanocompuestos en frutillas.

Para estos ensayos *in vivo* se utilizaron frutillas (*Fragaria* × *ananassa* variedad “Camarosa”) cosechadas en la provincia de Melipilla, Región Metropolitana (33°44’00”S 71°11’00”O) y adquiridas en el comercio de Talcahuano. Frutillas exteriormente sanas, sin lesiones visibles y con un nivel de maduración similar se esterilizaron superficialmente por inmersión en etanol 70 % por 3 segundos con posterior lavado con agua destilada estéril y secado con papel absorbente. El estudio del efecto antifúngico *in vivo* en frutillas se llevó a cabo siguiendo la técnica utilizada por Huang *et al.* [13]. Para la inoculación de las frutillas se prepararon suspensiones de conidias a partir de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* aisladas de frutillas infectadas. Los patógenos aislados fueron cultivados por 10 días a 25 °C en cápsulas de Petri con PDA. Las conidias formadas fueron separadas del agar con espátula estéril y filtradas a través de gasa estéril con agua destilada estéril hasta obtener una suspensión de 1×10^5 conidias mL^{-1} . El recuento de conidias se realizó utilizando un hemocitómetro Superior (Alemania) en conjunto con un microscopio Zeiss Photomicroscope III (Carl Zeiss AG, Alemania).

Bajo campana de flujo laminar, las frutillas superficialmente desinfectadas y secas se depositaron individualmente en cada compartimento de los envases de prueba (ver figura 3.3) y se inocularon de manera superficial depositando 20 μL de la suspensión de conidias en la zona ecuatorial de la frutilla con el cerrado inmediato de los envases con un trozo de film de

nano/bionanocompuesto en su interior. Este trozo de film fue de 70 mm de diámetro con espesores de $1,36 \pm 0,04$ mm para films de PEBD/MOM y de $1,95 \pm 0,26$ mm para films de ATP/MOM, y fue puesto en el fondo del envase (contacto directo con las frutillas) o adosado a la parte interior de la tapa (contacto indirecto con las frutillas), para ser dejados a temperatura ambiente ($18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) por cinco días alternando 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

La evaluación de la inhibición fúngica se realizó midiendo el crecimiento de hongo en las frutillas cuantificando el área de colonización en cada fruto. Para los cálculos de área de colonización micelial se fotografiaron las zonas dañadas con una cámara Canon PowerShot S2IS, (Canon Inc, Japón) y se calculó el área dañada utilizando el software Adobe Photoshop CS5[®] (Adobe Systems Incorporated, USA). Las microfotografías de las colonias miceliales en frutillas fueron tomadas a través de un microscopio Zeiss 47 50 52-9901 Stereo Zoom (Carl Zeiss AG, Alemania).

La CI_{50} de carga de principio activo en las formulaciones de films de nano/bionanocompuestos se calculó midiendo con el área de crecimiento micelial del hongo al quinto día de incubación, y aplicando un ajuste sigmoïdal de los datos según la ecuación (1).

3.2.8. Análisis sensorial de frutillas (*Fragaria* × *ananassa*) tras tratamiento con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol.

Para evaluar los posible cambios en las características físico-organolépticas de las frutillas sometidas a tratamiento con los nano/bionanocompuestos cargados con principios activos de aceites esenciales, se realizaron análisis sensoriales de tipo afectivo y discriminativo en las frutillas utilizando para ello jueces consumidores y jueces semi-entrenados respectivamente. Para los ensayos sensoriales se utilizaron frutillas frescas (*Fragaria* × *ananassa* variedad “Camarosa”) cosechadas en la provincia de Melipilla, Región Metropolitana ($33^\circ44'00''\text{S}$ $71^\circ11'00''\text{O}$) y adquiridas a través del comercio en la ciudad de Talcahuano. Los tratamientos en frutillas a evaluar con ensayos sensoriales se realizaron con frutillas visualmente sanas. Inmediatamente tras la adquisición de las frutillas, una cantidad suficiente de frutillas fue puesta en envases de soporte comercial de PET reciclado, transparente, de 340 cm^3 de volumen interno (frutillas control), y otra cantidad fue puesta en envases de PET, reciclado, de 340 cm^3 pero con trozos de film de nano/bionanocompuesto cargado con principio activo de 70 mm de diámetro y

espesor de $1,36 \pm 0,04$ mm para films de PEBD/MOM y $1,95 \pm 0,26$ mm para films de ATP/MOM, siendo los films adosados en la parte interior de la tapa superior del envase (frutillas con tratamiento) como se aprecia en la figura 3.3. Los envases se cerraron con las frutillas dentro y se dejaron de esta forma por 48 horas a temperatura ambiente alternando 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, siendo luego lavadas individualmente bajo chorro de agua potable por 3 segundos y puestas en envases de plástico cerrado para ser presentadas inmediatamente a los jueces para las pruebas sensoriales.

3.2.8.1. Prueba sensorial de medición del grado de satisfacción con escala hedónica verbal

Esta prueba sensorial de tipo afectiva consiste en conocer la reacción subjetiva por parte del juez frente a una muestra de frutilla control (A) y una muestra de frutilla con tratamiento (B). Frente a un juez no-entrenado (juez consumidor) se presentan dos muestras de frutillas dentro de un envase plástico cerrado codificado con números aleatorios de tres dígitos (ver figura 3.4). Las muestras se presentan a los jueces de manera aleatoria combinando las muestras control y tratamiento en las dos posiciones posibles: AB o BA [100], y explicitando que la degustación debe comenzar en un orden determinado, para así mantener la aleatoriedad del ensayo.

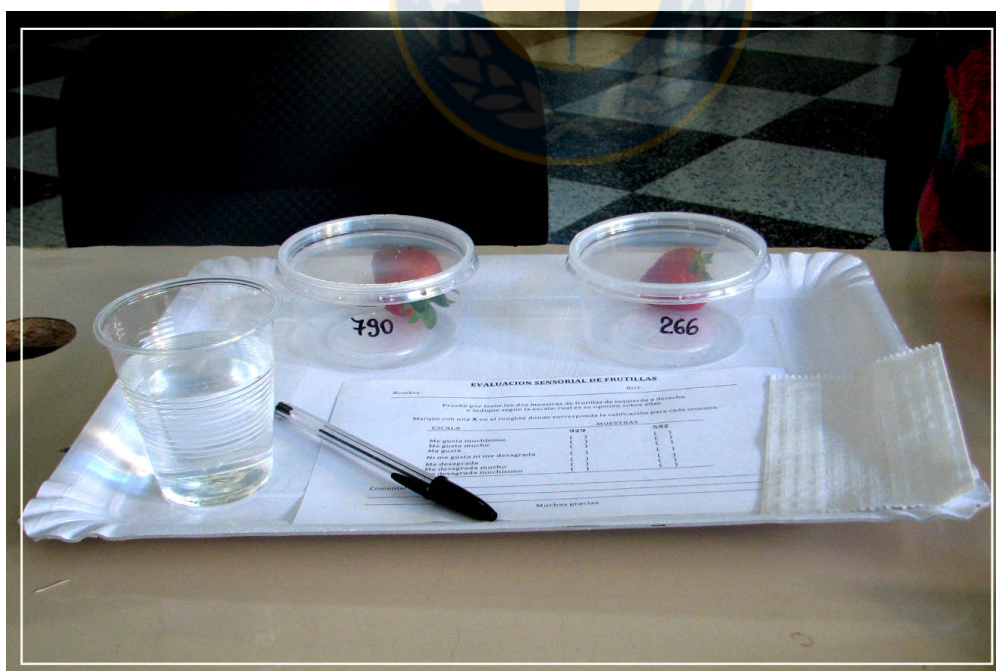


Figura 3.4. Bandeja presentada a los jueces en la prueba sensorial de medición del grado de satisfacción con escala hedónica verbal para frutillas tratadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol.

Junto a las muestras de frutillas se adjunta el siguiente cuestionario para ser contestado por los jueces:

EVALUACION SENSORIAL DE FRUTILLAS		
Nombre:	RUT:	
<hr/>		
<p>Pruebe por favor las dos muestras de frutillas de izquierda a derecha, e indique según la escala, cual es su opinión sobre ellas.</p>		
<p>Marque con una X en el renglón donde corresponda la calificación para cada muestra</p>		
ESCALA	MUESTRAS	
	790	266
Me gusta muchísimo	()	()
Me gusta mucho	()	()
Me gusta	()	()
Ni me gusta ni me desagrada	()	()
Me desagrada	()	()
Me desagrada mucho	()	()
Me desagrada muchísimo	()	()
Comentarios: _____		

Muchas gracias		

En el cuestionario se muestra una escala hedónica verbal de siete puntos en donde deben calificar la respectiva muestra codificada, y además cuenta con una sección de comentarios en donde el juez tiene la opción de justificar su calificación y dar mayor información acerca de sus razones. Para la evaluación de los datos de los cuestionarios, la escala de satisfacción verbal de siete categorías se transformó en una escala numérica de puntaje: -3, -2, -1, 0, +1, +2 y +3. Se calculó el promedio y la desviación estándar de los puntajes obtenidos para los controles y los tratamientos, y se sometieron a una prueba de *t* de Student para probar la hipótesis alternativa de que ambas medias (frutillas control y frutillas tratamiento) son diferentes.

3.2.8.2. Prueba sensorial discriminativa triangular

Esta prueba sensorial consiste en probar si el juez es capaz de diferenciar entre una muestra control (A) y una muestra con tratamiento (B), y de ser así, establecer la magnitud o importancia de esta diferencia. Frente a un juez semi-entrenado se presentan tres muestras de frutillas, cada una dentro de un envase plástico cerrado codificado con números aleatorios de tres dígitos, de las cuales dos frutillas son iguales y una es diferente (ver figura 3.5). Al juez se le exige que

detecte cual es la muestra diferente (“forced choice”). Las muestras se presentan a los jueces de manera aleatoria combinando las muestras control y tratamiento con alguna de las seis combinaciones posibles: AAB, ABA, BAA, BBA, BAB y ABB [101, 102] y explicitando que la degustación debe comenzar en un orden determinado, para mantener la aleatoriedad del ensayo.

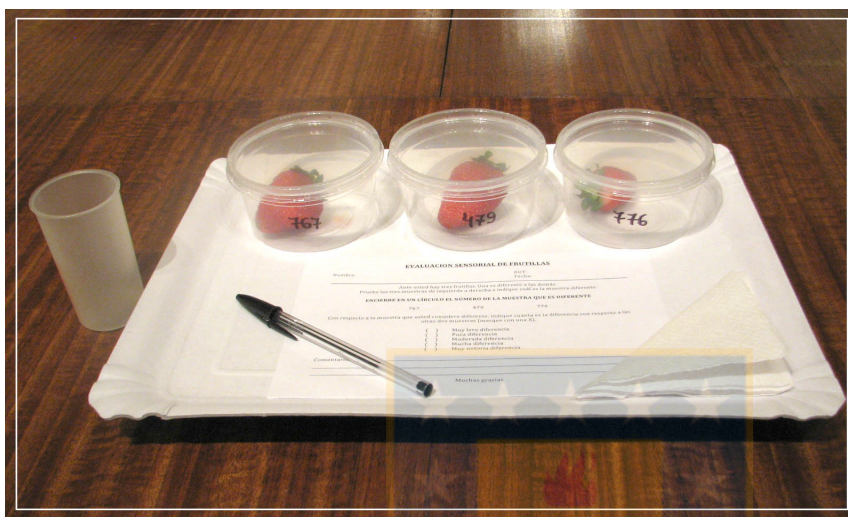


Figura 3.5. Bandeja presentada a los jueces en la prueba sensorial discriminativa triangular para frutillas tratadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol.

Junto a las tres muestras de frutillas se adjunta el siguiente cuestionario para ser contestado por los jueces:

EVALUACION SENSORIAL DE FRUTILLAS	
Nombre: _____	RUT: _____
Fecha: _____	
<p>Ante usted hay tres frutillas. Una es diferente a las demás. Pruebe las tres muestras de izquierda a derecha e indique cuál es la muestra diferente.</p> <p>ENCIERRE EN UN CÍRCULO EL NÚMERO DE LA MUESTRA QUE ES DIFERENTE</p> <p style="text-align: center;">767 479 776</p>	
<p>Con respecto a la muestra que usted considere diferente, indique cuanta es la diferencia con respecto a las otras dos muestras (marque con una X).</p> <p style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> Muy leve diferencia <input type="checkbox"/> Poca diferencia <input type="checkbox"/> Moderada diferencia <input type="checkbox"/> Mucha diferencia <input type="checkbox"/> Muy notoria diferencia </p>	
Comentarios: _____	

Muchas gracias	

El cuestionario consta además de una escala de magnitud donde el juez puede puntuar el grado de diferencia que él detecta en la muestra que él califica como diferente con respecto a las otras dos, y además de una sección de comentarios en donde el juez tiene la opción de justificar su elección dando mayor información acerca de ésta. Para la evaluación estadística de los datos, se tomaron los cuestionarios y se sumaron las respuestas correctas (cuando el juez fue capaz de identificar la muestra diferente) y las incorrectas (cuando el juez no fue capaz de identificar la muestra diferente) y mediante tablas de distribución binomial [101] se puede decidir si el número de respuestas correctas establece una diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento.

3.2.9. Análisis de calidad de frutillas (*Fragaria* × *ananassa*) tratadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol.

Para evaluar la calidad de las frutillas tratadas con nano/bionanocompuestos utilizadas en los ensayos sensoriales, se realizaron mediciones de color, textura y pérdida de masa. Para esto se procedió a evaluar estas características en frutillas frescas del mismo origen y variedad que en la sección 3.2.8. Inmediatamente tras su adquisición, las frutillas fueron empacadas según el procedimiento descrito en la sección 3.2.8. Se empacaron tres grupos ($n = 12$) sin nano/bionanocompuestos por 2 días (control) a temperatura ambiente, y tres grupos ($n = 12$) para ambos tratamientos con trozos de nano/bionanocompuestos de 70 mm de diámetro con espesor de $1,36 \pm 0,04$ mm para films de PEBD/MOM y $1,95 \pm 0,26$ mm para films de ATP/MOM por un período de 2 días (tratamiento).

3.2.9.1. Análisis de pérdida de masa

El análisis de pérdida de masa se llevó a cabo pesando individualmente cada frutilla antes y después del tiempo de tratamiento. Para ello se utilizó una balanza analítica Snowrex EJ-600 (Snowrex International Co., Taiwan) con precisión de 0,01 g. Los resultados fueron expresados como porcentaje de pérdida de masa inicial, y se determinó si existe diferencia significativa entre la pérdida de masa del control y la pérdida de masa de los tratamientos. Esto se llevó a cabo por análisis de varianza (ANOVA) y test de comparación múltiple de Bonferroni.

3.2.9.2. Análisis de color externo

El análisis de color externo en frutillas fue evaluado usando un colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Optics Inc., Japón). Tomando el espacio color CIELAB (CIE 1976 $L^*a^*b^*$) se midieron los valores de L^* , a^* y b^* en cuatro puntos diferentes de la zona ecuatorial de cada frutilla. L^* corresponde a luminosidad, a^* (-verde a +rojo) y b^* (-azul a +amarillo) corresponden a las coordenadas de cromaticidad. A partir de los valores de a^* y b^* se calcularon los valores de croma métrica (C^*) correspondiente a la brillantez, el ángulo de tono métrico (h) que representa una coordenada en un espacio de color estandarizado, y la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) que indica el grado de diferencia de color entre muestra y control. Estos últimos parámetros son calculados mediante las fórmulas $C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$, $h = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$, y $\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$, donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son las diferencias entre L^* , a^* y b^* entre el tratamiento y el control [103–105]. Los valores de L^* , C^* , h y ΔE^*_{ab} fueron medidos y calculados para muestras de frutillas control y frutillas tratadas antes y después 2 días de empacado a temperatura ambiente en los diferentes empaques a evaluar. La significancia de los cambios de color externo después de los tratamientos se calcularon mediante la prueba de t de Student.

3.2.9.3. Análisis de firmeza

El análisis de firmeza en frutillas se llevó a cabo utilizando un analizador universal de textura CT3 Texture Analyzer (Brookfield Engineering, USA). Las mediciones fueron de tipo compresión y con distancia como objetivo test, utilizando una sonda TA39, con velocidad de test $1,0 \text{ mm s}^{-1}$ y valor meta 3,0 mm. Se tomaron mediciones de firmeza en cuatro puntos diferentes de la zona ecuatorial para $n = 12$ frutillas frescas, y luego se midieron en frutillas control y frutillas tratadas por 2 días de empacado a temperatura ambiente en los diferentes empaques a evaluar. La significancia de los cambios de firmeza después de los tratamientos se calcularon mediante la prueba de t de Student.

3.2.10. Análisis estadístico de datos

Para los análisis estadísticos de datos correspondientes a ANOVA, t de Student, prueba de Kruskal-Wallis, test de significancia estadística de Holm-Sidak, test de comparación múltiple de

Bonferroni y cálculos de CI_{50} se utilizó el software GraphPad Prism[®] 6.0c (GraphPad, EE.UU.). Para la elaboración y cálculos de diseños de experimentos (factorial completo, central compuesto y D-optimal), análisis de metodología superficie respuesta (RSM), optimización por método SIMPLEX, análisis de regresión lineal múltiple (MLR) y análisis de regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR) se utilizó el software MODDE[®] 7.0 (Umetrics, Suecia).



CAPÍTULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis, caracterización y optimización de las propiedades de empaque de nano/bionanocompuestos

Para lograr de manera efectiva y precisa un estudio de optimización de síntesis en donde muchas variables influyen en una o más respuestas, el diseño de experimentos (DOE) es la opción apropiada. DOE permite establecer y conocer las relaciones entre variables y respuestas, y como estas variables influyen en el resultado final de un proceso. Se basa en variar de manera sistemática y simultánea todas las variables estudiadas de manera multivariada con un número mínimo de experimentos, ahorrando de esta forma, reactivos, tiempo y costo [106].

El grado de intercalación de las cadenas poliméricas entre las láminas de la nanoarcilla en un nanocompuesto está en directa relación con las nobles propiedades que poseen los nanocompuestos: resistencia mecánica, resistencia térmica, propiedades de barrera a los gases, etc. [107], por lo que la medición de la intercalación en un nanocompuesto es un buen parámetro a medir como punto de partida para inspeccionar que componentes de la formulación y que parámetros de proceso son los que impactan significativamente en la intercalación o exfoliación de nanocompuestos.

4.1.1. Optimización de las propiedades de empaque de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido: primer diseño de experimentos.

Nanocompuestos de PEBD/MOM fueron sintetizados mediante el método de mezclado en estado fundido, y para evaluar la influencia de las variables presentes en la formulación de los nanocompuestos y de los parámetros de proceso de su síntesis, se realizó un primer estudio multivariado de las variables experimentales que pudieran influir en el nivel de intercalación del nanocompuesto midiendo para ello la distancia interlaminar d_{001} mediante DRX como respuesta. Como primer ensayo se evaluaron cuatro variables: x_1 la velocidad de mezclado (v_{mix}), x_2 el tiempo de mezclado (t_{mix}), x_3 la temperatura de mezclado (T_{mix}) y x_4 la carga de nanoarcilla en la formulación (%Arcilla). Para la variable x_4 %Arcilla se utilizó la nanoarcilla montmorillonita orgánicamente modificada con grupos dimetil dialquil (C14–C18) amina (Nanomer[®] I.44P), la

cual fue evaluada frente a otras nanoarcillas modificadas en estudios preliminares. Difractogramas de DRX (ver figura 4.1) mostraron que los mayores niveles de intercalación se lograron con esta nanoarcilla Nanomer I.44P producto del mayor corrimiento de los peaks de difracción a ángulos más bajos, lo cual se corroboró con microfotografías de TEM (ver figura 4.1) en donde se aprecia capas individuales de arcilla separadas, lo que indica intercalación de polímero.

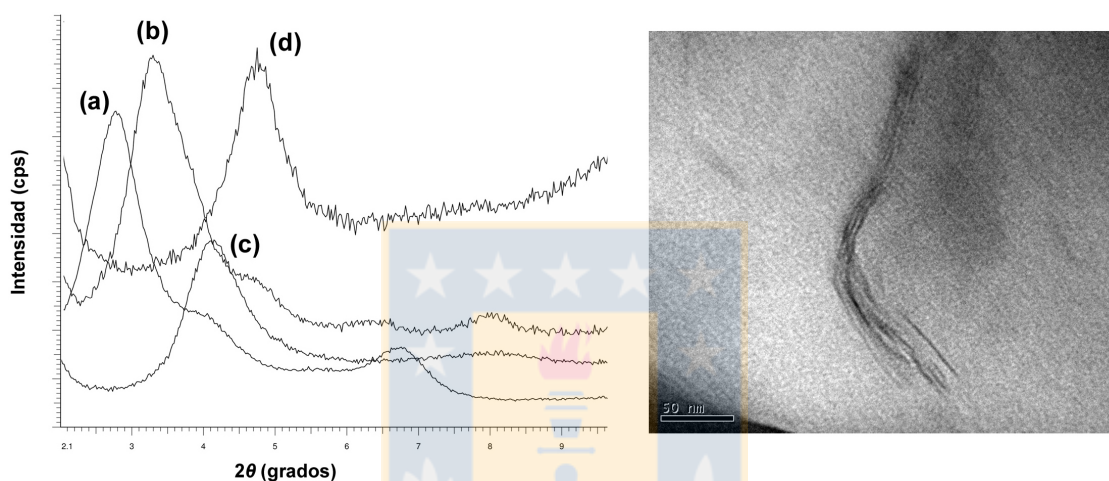


Figura 4.1. A la izquierda: difractogramas de DRX nanocompuestos de PEBD/MOM con 5 %m/m de nanoarcilla (a) Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina) $d_{001} = 33,00$ nm, (b) Nanomer[®] I.30E (octadecilamina) $d_{001} = 20,53$ nm, (c) Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina) $d_{001} = 20,80$ nm, (d) Nanomer[®] montmorillonita sódica $d_{001} = 12,74$ nm. A la derecha microfotografía TEM de nanocompuesto de PEBD/MOM utilizando Nanomer I.44P al 5 %m/m en la formulación.

Tabla 4.1. Primer diseño experimental de tipo factorial completo (FFD) de dos niveles (2^4) para el estudio de parámetros de formulación y proceso en la síntesis de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.

	x_1 Velocidad mezclado v_{mix} (rpm)	x_2 Tiempo de mezcla t_{mix} (min)	x_3 Temperatura de mezcla T_{mix} (°C)	x_4 %Arcilla ^a (%m/m)
Puntos centrales (0) ^b	50	17,5	140	3,5
Puntos de esquina (-1/1)	40 / 60	10 / 25	130 / 150	2,0 / 5,0

^a Nanomer[®] I.44P.

^b Valores en paréntesis son los valores codificados de los niveles de las variables: (-1) = nivel menor de punto esquina, (0) = nivel central, (1) = nivel mayor de punto esquina.

Tabla 4.2. Datos experimentales del primer diseño experimental factorial completo (FFD) de dos niveles (2^4) para la síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.

Exp ^a	Variables				Respuesta ^c
	x_1 v_{mix} (rpm)	x_2 t_{mix} (min)	x_3 T_{mix} (°C)	x_4 %Arcilla ^b (%m/m)	y d_{001} (nm)
1	40 (-1) ^d	10 (-1)	130 (-1)	2 (-1)	31,782
2	60 (+1)	10 (-1)	130 (-1)	2 (-1)	31,289
3	40 (-1)	25 (+1)	130 (-1)	2 (-1)	31,554
4	60 (+1)	25 (+1)	130 (-1)	2 (-1)	32,482
5	40 (-1)	10 (-1)	150 (+1)	2 (-1)	33,696
6	60 (+1)	10 (-1)	150 (+1)	2 (-1)	32,688
7	40 (-1)	25 (+1)	150 (+1)	2 (-1)	31,575
8	60 (+1)	25 (+1)	150 (+1)	2 (-1)	32,044
9	40 (-1)	10 (-1)	130 (-1)	5 (+1)	31,723
10	60 (+1)	10 (-1)	130 (-1)	5 (+1)	30,827
11	40 (-1)	25 (+1)	130 (-1)	5 (+1)	31,265
12	60 (+1)	25 (+1)	130 (-1)	5 (+1)	31,417
13	40 (-1)	10 (-1)	150 (+1)	5 (+1)	– ^e
14	60 (+1)	10 (-1)	150 (+1)	5 (+1)	32,351
15	40 (-1)	25 (+1)	150 (+1)	5 (+1)	31,400
16	60 (+1)	25 (+1)	150 (+1)	5 (+1)	31,372
17	50 (0)	17,5 (0)	140 (0)	3,5 (0)	31,950
18	50 (0)	17,5 (0)	140 (0)	3,5 (0)	31,448
19	50 (0)	17,5 (0)	140 (0)	3,5 (0)	–

^a Número de experimentos en el diseño.

^b Nanomer® I.44P.

^c Valores experimentales de d_{001} obtenidos por difractogramas de DRX.

^d Valores codificados para las variables.

^e Datos faltantes o excluidos.

Para este primer estudio *screening* de variables se planificó un diseño experimental factorial completo (FFD) de cuatro variables a dos niveles, el que se presenta en la tabla 4.1. Además de determinar la influencia y el impacto de estas variables sobre la respuesta medida, con este tipo de diseño experimental se puede determinar además si existen interacciones significativas entre las variables estudiadas. Como las variables experimentales x son cuatro y se estudiaron en dos niveles, el diseño constó de 2^x experimentos. En la tabla 4.2 se presenta en detalle este diseño experimental, el cual constó de $2^4 = 16$ experimentos más el punto central en triplicado, dando un total de 19 experimentos. Los niveles estudiados para cada variable fueron dos, los cuales se codifican como (-) y (+) para el nivel alto y el nivel bajo de cada variable. Se debe incluir en el diseño un nivel central (0) para cada variable al menos en triplicado, principalmente para (a)

detectar relaciones no lineales a mitad del intervalo de los niveles estudiados, (b) calcular la varianza del modelo, y (c) determinar los intervalos de confianza.

En la tabla 4.2 se puede apreciar que cada variable fue codificada para que el nivel mayor y menor varíe entre -1 y $+1$. Esta normalización tiene por objetivo poder trabajar con variables que poseen diferentes unidades y magnitudes, así al trabajar con valores codificados normalizado se pueden relacionar y comparar unas con otras.

El fin del diseño experimental es modelar la relación existente entre las diferentes variables x a estudiar y la respuesta y medida, lo cual se logra obteniendo un modelo matemático que represente dicha calibración. Mediante regresión lineal múltiple (MLR) se obtuvo este modelo matemático a la forma de una ecuación polinomial, la cual de acuerdo al diseño utilizado tiene la forma de una ecuación de segundo orden con interacciones (ver ecuación (2))

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (2)$$

en donde y es la respuesta medida (d_{001}), x son los valores codificados de las variables, b_0 es la constante de la ecuación, y los diferentes b son los coeficientes de regresión del polinomio. Estos coeficientes permiten conocer la relación existente entre cada variable y la respuesta. Como las variables usadas en el modelo tienen sus valores normalizados de -1 a $+1$, el impacto relativo de cada variable está directamente relacionada con el tamaño del coeficiente de regresión, esto quiere decir que mientras más grande el valor del coeficiente (ya sea positivo o negativo), esa variable tiene un mayor impacto sobre la respuesta. No todos los coeficientes obtenidos en un modelo son estadísticamente significativos, y por tanto si un coeficiente es cercano a cero o no tiene una significancia estadística mínima, quiere decir que la variable x asociada a ese coeficiente no tiene impacto en la respuesta, y por tanto puede ser excluida del modelo, lo cual permite refinar el modelo propuesto [108].

Para evaluar el ajuste del modelo y por tanto su confiabilidad, se debe examinar la variación explicada y la variación predicha. La variación explicada se expresa mediante R^2 (bondad del modelo), el cual es la fracción de la variación total de la respuesta que se explica en el modelo, y se calcula mediante la ecuación (3)

$$R^2 = \frac{(SS - SS_{resid})}{SS} \quad (3)$$

donde SS es la suma de los cuadrados de la variación total de la respuesta corregida por el promedio, y SS_{resid} es la cantidad de variación que no puede ser modelada debido a los residuales (variables no estudiadas). Este R^2 puede tener valores entre 0 y 1, en donde 1 indica un modelo que se ajusta de manera perfecta a los datos experimentales, y 0 indica que el modelo no se ajusta en absoluto. La variación predicha se expresa por medio de Q^2 (bondad de predicción), la cual es la fracción de la variación total de la respuesta que puede ser predicha en el modelo, y se calcula mediante la ecuación (4)

$$Q^2 = \frac{(SS - PRESS)}{SS} \quad (4)$$

en donde PRESS es la suma de cuadrados de los residuales de predicción, y se determina a través de validación cruzada. Este valor de Q^2 puede ir desde 1 a $-\infty$, e indica un buen modelo cuando existe una diferencia de entre 0,2 y 0,3 con respecto a R^2 [109].

Además, están los valores de validación y de reproducibilidad que son parámetros que permiten complementar la información de la calidad del modelo. Cuando el valor de validación del modelo es mayor a 0,25 no hay falta de ajuste en el modelo, y cuando este valor es menor a 0,25 se tiene una significativa falta de ajuste. La reproducibilidad es una medida del control del error experimental, y cuando este valor es alto se tiene un buen control del error experimental. Por otro lado, el número de condición es también una herramienta que permite evaluar la performance del diseño de experimento antes de su ejecución. Matemáticamente es el ratio del valor más grande y más pequeño de la matriz de datos de las variables \mathbf{X} , es decir del ratio entre la diagonal más larga y la más corta en esta matriz, así se puede medir la esfericidad u ortogonalidad del diseño. Para diseños experimentales de *screening* un buen valor es < 3 , y para diseños de experimentales de optimización deben ser < 8 [109].

La evaluación del modelo obtenido para este primer diseño experimental se resume en la tabla 4.3, y estos parámetros de evaluación muestran que el modelo se ajusta muy bien a la respuesta experimental. La figura 4.2a muestra la concordancia entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo, el cual tiene un R^2 de 0,920, el cual nos indica un excelente ajuste y además un buen poder predictivo ($Q^2 = 0,793$). Los valores de los coeficientes de regresión se presentan en la tabla 4.4, en donde el coeficiente b_{13} del término de interacción x_1x_3 (interacción entre la velocidad de mezclado y temperatura de mezclado) fue dejado fuera por no

influir significativamente en la respuesta. Una manera gráfica de apreciar estos coeficientes, y por tanto el impacto de cada variable en la respuesta medida, es por medio del gráfico de coeficientes, el cual se presenta en la figura 4.2b donde además se muestra el error estándar de cada uno de ellos.

Tabla 4.3. Evaluación del modelo obtenido por MLR a partir del primer diseño de experimentos de tipo factorial completo (FFD) para la síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.

Parámetro del modelo	Valor
R^2	0,9198
Q^2	0,7928
Validez del modelo	0,9593
Reproducibilidad	0,7227
Número de condición	1,3878

El modelo se evaluó por medio de test de ANOVA y test de falta de ajuste. En la tabla A.1 (ver Anexo A) se aprecia que la significancia del modelo de regresión tiene un valor de $p < 0,000$ por lo que es un modelo satisfactorio y confiable. La comparación del error del modelo con el error de réplicas arroja un valor de $p > 0,05$ ($p = 0,850$) que indica que el modelo no tiene falta de ajuste, y muestra por tanto un buen ajuste de los datos. Teniendo la validación estadística del modelo, se tiene garantías para interpretar los coeficientes de regresión obtenidos de dicho modelo.

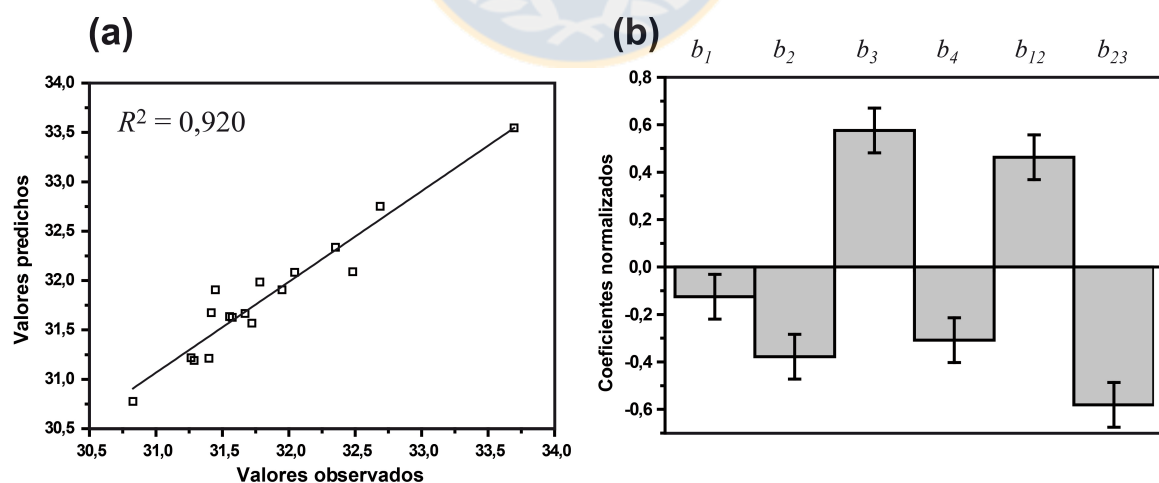


Figura 4.2. (a) Gráfico de valores observados vs. valores predichos de distancia interlamina d_{001} del modelo obtenido por MLR para síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido. (b) Gráfico de coeficientes del polinomio para la respuesta d_{001} calculados por MLR: (b_1) velocidad de mezcla v_{mix} ; (b_2) tiempo de mezcla t_{mix} ; (b_3) temperatura de mezcla T_{mix} ; (b_4) %Arcilla; (b_{12}) interacción $v_{mix} \times t_{mix}$; (b_{23}) interacción $t_{mix} \times T_{mix}$.

Tabla 4.4. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados mediante MLR para la respuesta de distancia interlamina d_{001} obtenida de films de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido.

Término del polinomio	$b \pm$ error estándar valor de p
constante b_0	$47,319 \pm 0,088$ $p = 0,000$
b_1 Velocidad de mezclado v_{mix}	$-0,126 \pm 0,094$ $p = 0,213$
b_2 Tiempo de mezclado t_{mix}	$-0,378 \pm 0,094$ $p = \mathbf{0,003}$
b_3 Temperatura de mezcla T_{mix}	$0,576 \pm 0,094$ $p = \mathbf{0,000}$
b_4 %Arcilla	$-0,308 \pm 0,094$ $p = \mathbf{0,008}$
b_{12} Velocidad mezcla \times Tiempo de mezcla $v_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$	$0,463 \pm 0,094$ $p = \mathbf{0,001}$
b_{23} Tiempo de mezcla \times Temperatura de mezcla $t_{\text{mix}} \times T_{\text{mix}}$	$-0,581 \pm 0,094$ $p = \mathbf{0,000}$

^a Coeficiente de regresión normalizado \pm error estándar, incluido el valor de p .

En el gráfico de coeficientes (ver figura 4.2b) se aprecia que entre las variables individuales, la temperatura de mezcla T_{mix} posee un coeficiente grande y de signo positivo ($b_3 = 0,576$) lo que se traduce en que trabajando a temperaturas cercanas a 150 °C (nivel alto +1) la respuesta d_{001} aumenta, o sea, se alcanzan valores más altos y por tanto aumenta la intercalación de la nanoarcilla (ver figura 4.3c). El %Arcilla tiene un coeficiente de regresión negativo lo que indica que cuando %Arcilla disminuye, aumenta el valor de d_{001} (ver figura 4.3d), esto tiene coincidencia con reportes que indican que buenas intercalaciones se pueden obtener a bajas concentraciones de arcilla en la formulación y que aumentar la concentración de estas no lleva necesariamente a un aumento en la intercalación [110].

La velocidad de mezclado v_{mix} tiene una muy poca influencia en la intercalación del polímero en la nanoarcilla, esto puede ser debido a que la mezcladora utilizada no alcanza velocidades muy altas, teniendo un máximo de 60 rpm, lo que de acuerdo a trabajos similares que utilizan este tipo de mezcladoras, se necesitan velocidades mayores a 100 rpm para influir en la intercalación [111]. Aunque esta variable por sí sola tiene poca influencia en la respuesta, no se excluyó del modelo ya que muestra una interacción significativa con el tiempo de mezcla t_{mix} , el cual se aprecia en la figura 4.2b, y posee un valor de coeficiente b_{12} de 0,463. Graficando estas interacciones, en la figura 4.4a se desprende que utilizando altas v_{mix} , el t_{mix} no influye en la

respuesta, pero a bajas v_{mix} , se debe trabajar a bajos t_{mix} para obtener mejores valores de intercalación. Además se detecta una interacción entre T_{mix} y t_{mix} (ver figura 4.2b) en donde trabajando a bajas T_{mix} la variación de t_{mix} no influye en la respuesta, pero a alta T_{mix} se debe trabajar a menores t_{mix} para lograr una alta intercalación (ver figura 4.4b).

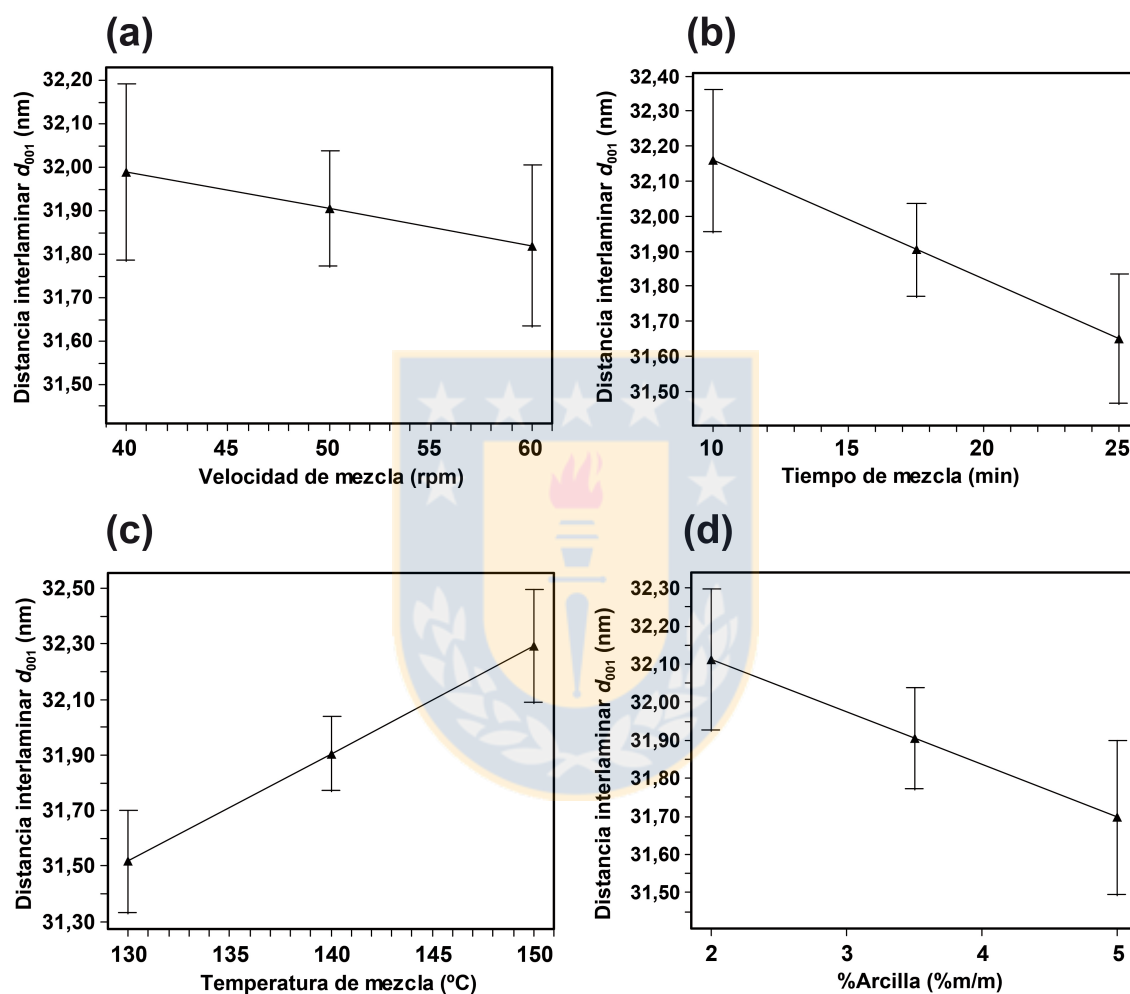


Figura 4.3. Gráfico de efectos de las variables sobre la distancia interlamina d_{001} medida en films de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido. Se indica el intervalo de confianza del 95 % en cada gráfico.

Teniendo la región experimental estudiada para estas cuatro variables en los rangos medidos, se puede mediante metodología de superficie respuesta (RSM) generar una perspectiva gráfica de cómo se comporta el sistema estudiado.

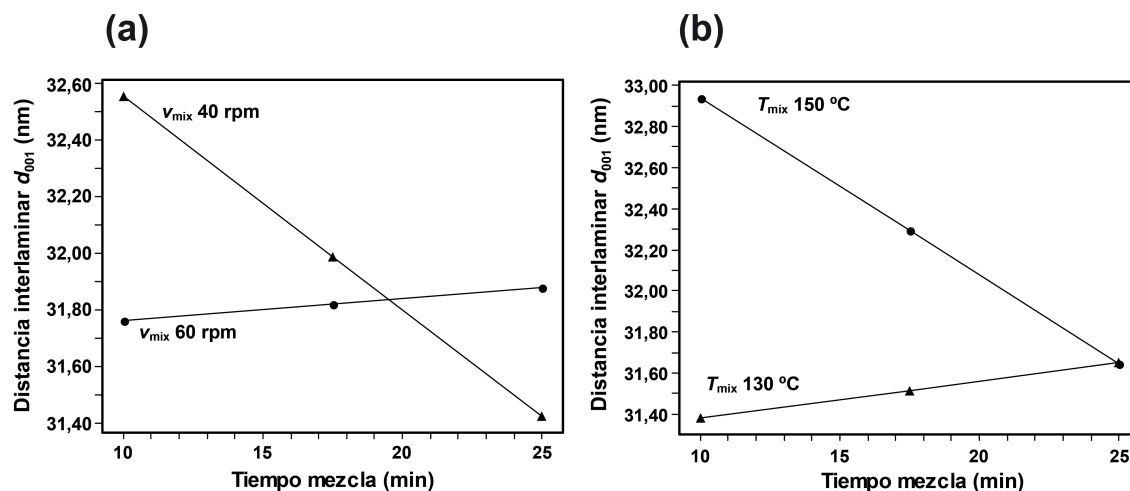


Figura 4.4. Gráfico de interacciones entre variables para la respuesta de distancia interlaminar d_{001} medida en films de PEBD/MOM: (a) interacción entre v_{mix} y t_{mix} , (b) interacción entre T_{mix} y t_{mix} .

RSM se basa en un set de técnicas estadísticas y matemáticas que permiten describir el comportamiento del sistema a lo largo de toda la zona experimental estudiada, dando como resultado mapas de superficie respuestas que predicen los valores de y para una combinación dada de las variables x dentro del área experimental que se estudió mediante el diseño de experimentos [112]. En la figura 4.5a y 4.5b se observan los gráficos de contorno 2D que muestra hacia donde se encuentran los valores más altos de intercalación (zona roja) y los valores menores de intercalación (zona azul). Los mapas de superficie respuesta 3D de la figura 4.5c y 4.5d muestran una forma “torcida” lo que indica interacción entre las variable, información entregada por los coeficientes del polinomio.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este primer diseño de experimentos, se puede concluir que los rangos en los que se utiliza la velocidad de mezclado para la síntesis de nanocompuestos, no influye mayormente en los valores de intercalación de estos. Además, se debe tener en consideración las interacciones entre T_{mix} , v_{mix} y t_{mix} , considerando que uno de los objetivos del uso de nanocompuestos es usarlo como *carrier* para principios activos antimicrobianos que son altamente volátiles por lo que el equilibrio T_{mix}/t_{mix} es crucial para minimizar las pérdidas de droga durante la síntesis. Además, el aumento de 2 a 5 % en masa de arcilla en la formulación no produce un aumento significativo del nivel de intercalación.

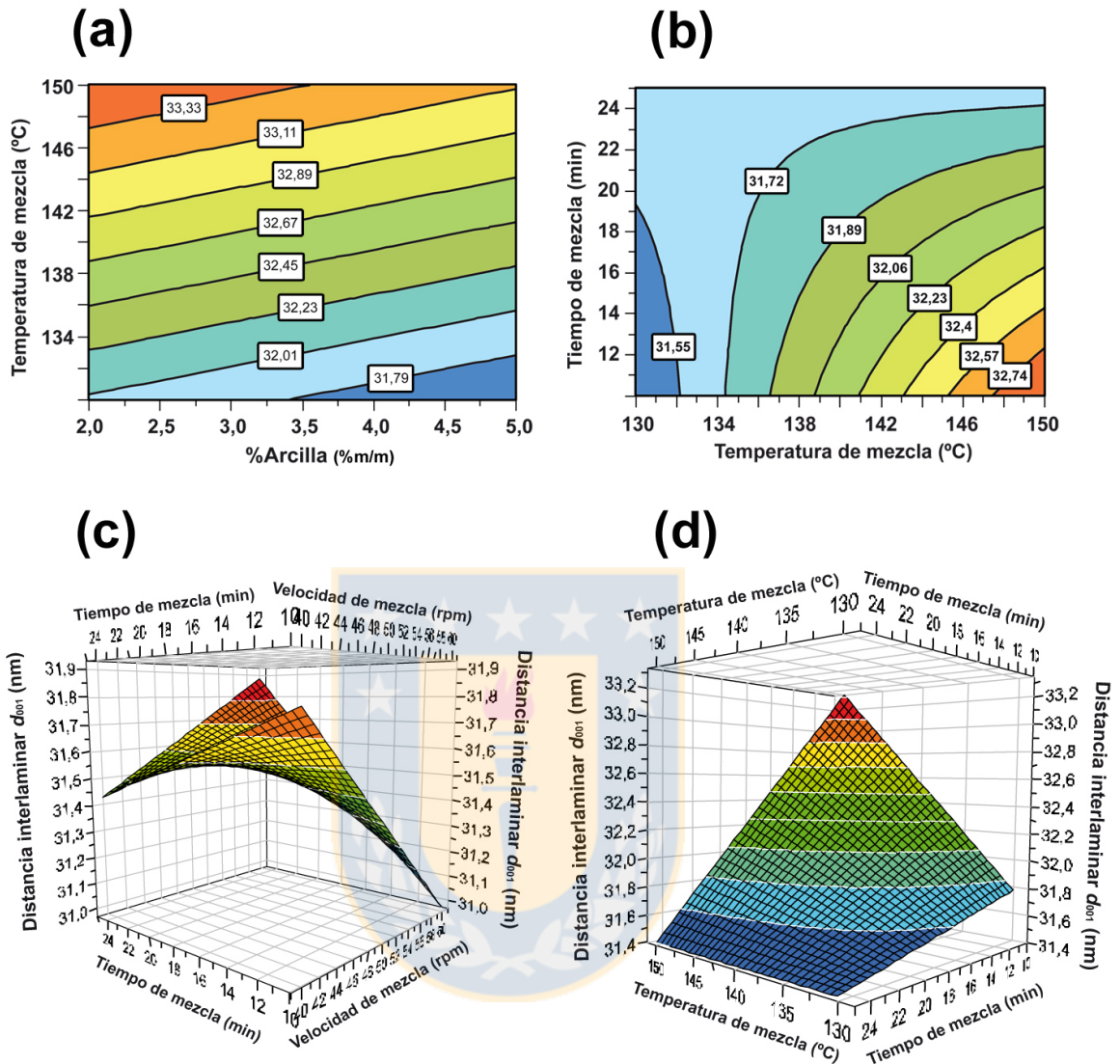


Figura 4.5. Gráfico de contorno 2D y mapas de superficie respuesta 3D para la respuesta de distancia interlaminar d_{001} en films de nanocompuestos de PEBD/MOM: (a) T_{mix} vs. %Arcilla con valores fijos de $t_{mix} = 10$ min y $v_{mix} = 40$ rpm, (b) T_{mix} vs. t_{mix} con valores fijos de $v_{mix} = 50$ rpm y %Arcilla = 3,5 %/m, (c) t_{mix} vs. v_{mix} con valores fijos de $T_{mix} = 130$ °C y %Arcilla = 3,5 %/m, (d) T_{mix} vs. t_{mix} con valores fijos de $v_{mix} = 50$ rpm y %Arcilla = 3,5 %/m.

4.1.2. Optimización de las propiedades de empaque de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido: segundo diseño de experimentos.

Con los resultados obtenidos en el primer diseño experimental *screening* se pudo tener un acercamiento hacia qué variables de proceso son las más importantes para la intercalación del polímero en las láminas de la nanoarcilla, cuales no influyen significativamente, y cuales son las interacciones entre variables que existen. Como siguiente paso se diseñó un segundo experimento multivariado con el objetivo esta vez de optimizar las condiciones de formulación y los parámetros de proceso más importantes con el fin de obtener un material nanocompuesto que posea las propiedades deseadas para ser utilizado como material de empaque.

Para una caracterización completa de nanocompuestos como material de empaque se deben medir muchas propiedades diferentes: morfológicas, mecánicas, térmicas, reológicas, de permeabilidad, ópticas, etc., y para definir las variables óptimas en su síntesis se deben correlacionar de manera profunda, detallada y simultánea varias variables x con varias propiedades o respuestas y . Se debe entender la correlación de variables y respuestas como un set complejo de datos experimentales, y para modelar esto de manera integral, la regresión por cuadrados parciales mínimos (PLSR) es un método de calibración multivariada que combina aspectos de la regresión por componentes principales (PCR) y la regresión lineal múltiple (MLR). Es la opción pertinente cuando (a) existen varias variables x que están correlacionadas con varias respuestas y , (b) hay datos faltantes en el trabajo experimental [113].

Tabla 4.5. Segundo diseño de experimentos de tipo circunscrito central compuesto (CCC) para la síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido.

	x_1 %Arcilla ^a (%m/m)	x_2 %Comp. (%m/m)	x_3 Temperatura de mezcla T_{mix} (°C)	x_4 Tiempo de mezcla t_{mix} (min)
Puntos centrales (0) ^b	5.0	8.0	150	14
Puntos de esquina (-1/1)	3,0 / 7,0	4,0 / 12,0	130 / 170	7 / 21
Puntos estrella (-2/2)	1,0 / 9,0	0 / 16,0	120 / 190	2 / 28

^a Nanomer[®] I.44P.

^b Valores en paréntesis son los valores codificados de los niveles de las variables: (-2) = nivel menor de punto estrella, (-1) = nivel menor de punto esquina, (0) = nivel central, (1) = nivel mayor de punto esquina, (2) = nivel mayor de punto estrella.

Teniendo en cuenta el primer diseño experimental de *screening*, se realizó el segundo diseño de experimentos central compuesto de tipo circunscrito central compuesto (CCC) para optimizar cuatro variables de proceso y de formulación: x_1 carga de nanoarcilla en la formulación (%Arcilla), x_2 cantidad de compatibilizante (%Comp), x_3 la temperatura de mezclado (T_{mix}), y x_4 el tiempo de mezclado (t_{mix}) cuyos niveles se detallan en la tabla 4.5.

El efecto de estas cuatro variables se estudiaron sobre seis propiedades diferentes de los nanocompuestos: propiedades morfológicas a través de y_1 distancia interlaminar (d_{001}), propiedades térmicas a través de y_2 temperatura de descomposición ($T_{0.05}$) e y_3 temperatura de fusión (T_m), propiedades mecánicas a través de y_4 módulo de Young (E), y propiedades reológicas a través de y_5 módulo de pérdida (G'') e y_6 módulo de almacenamiento (G').

Una de las variables a estudiar es la influencia de un agente compatibilizante (x_2). Para ello se utilizó en la formulación polietileno lineal de baja densidad modificado con anhídrido maléico (Polybond® 3149) como compatibilizante. Se evaluaron nuevamente las variables de T_{mix} , t_{mix} y %Arcilla pero esta vez en un rango más amplio con el fin de encontrar un valor óptimo. Al no ser significativamente influyente, la v_{mix} se dejó a 50 rpm considerando los resultados del primer estudio multivariado.

Con el diseño de experimento circunscrito central compuesto (CCC) se evaluó para cada variable dos niveles esquina, dos niveles axiales y un nivel central (5 niveles en total para cada variable), lo que resulta en 24 experimentos más el punto central por triplicado, siendo 27 experimentos en total. Los puntos axiales o puntos estrellas se fijan a una distancia \sqrt{n} (n = número de variables evaluadas) desde los puntos centrales, por lo que se codifican como -2 y $+2$. Este diseño se resume en la tabla 4.6 junto a los resultados experimentales obtenidos.

La modelación de las cuatro variables x con las seis respuestas medidas y se realizó de manera simultánea mediante PLSR. La ventaja de esta modelación por sobre la modelación individual de cada respuesta por MLR es que se pueden correlacionar de manera unificada las variables x con las respuestas y , y se puede tener una visión global de sus interrelaciones. PLSR comprime las variables y encuentra nuevas combinaciones lineales (PLS-componentes) a partir de las variables y respuestas originales, y usa solo estos pocos componentes de la variación en la regresión [114].

Tabla 4.6. Datos experimentales del segundo diseño de experimento Circunscrito central compuesto (CCC) para la optimización de síntesis de films nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.

Exp ^a	Variables				Respuestas					
	x_1 %Arcilla ^b (%m/m)	x_2 %Comp. (%m/m)	x_3 T_{mix} (°C)	x_4 t_{mix} (min)	y_1 d_{001} (nm)	y_2 $T_{0.05}$ (°C)	y_3 T_m (°C)	y_4 E (MPa)	y_5 G'' (Pa)	y_6 G' (Pa)
1	3,0 (-1) ^c	4,0 (-1)	130 (-1)	7 (-1)	33,121	377,99	112,19	394,88	2697,6	1231,5
2	7,0 (+1)	4,0 (-1)	130 (-1)	7 (-1)	– ^d	306,95	113,14	457,83	3885,6	2620,4
3	3,0 (-1)	12,0 (+1)	130 (-1)	7 (-1)	32,089	414,75	112,27	460,40	5729,6	3780,0
4	7,0 (+1)	12,0 (+1)	130 (-1)	7 (-1)	–	248,03	112,72	474,16	4856,6	4395,7
5	3,0 (-1)	4,0 (-1)	170 (+1)	7 (-1)	33,002	376,01	112,35	432,57	2531,1	1150,4
6	7,0 (+1)	4,0 (-1)	170 (+1)	7 (-1)	31,281	321,83	–	464,49	5070,1	2914,5
7	3,0 (-1)	12,0 (+1)	170 (+1)	7 (-1)	–	391,19	112,32	474,56	5788,7	3711,7
8	7,0 (+1)	12,0 (+1)	170 (+1)	7 (-1)	31,855	333,77	–	–	8390,7	7298,1
9	3,0 (-1)	4,0 (-1)	130 (-1)	21 (+1)	33,353	323,26	–	420,82	3335,2	1574,7
10	7,0 (+1)	4,0 (-1)	130 (-1)	21 (+1)	31,590	350,02	113,06	478,16	3583,8	2337,2
11	3,0 (-1)	12,0 (+1)	130 (-1)	21 (+1)	32,093	383,75	112,56	471,47	4425,8	3142,9
12	7,0 (+1)	12,0 (+1)	130 (-1)	21 (+1)	32,991	297,92	112,83	508,19	6716,0	6089,0
13	3,0 (-1)	4,0 (-1)	170 (+1)	21 (+1)	33,633	381,56	111,73	440,14	4109,0	1740,5
14	7,0 (+1)	4,0 (-1)	170 (+1)	21 (+1)	31,523	341,83	112,47	494,91	5196,0	2824,2
15	3,0 (-1)	12,0 (+1)	170 (+1)	21 (+1)	31,501	390,37	112,04	497,45	6287,2	4123,4
16	7,0 (+1)	12,0 (+1)	170 (+1)	21 (+1)	32,271	377,02	112,65	547,57	8310,0	7595,6
17	1,0 (-2)	8,0 (0)	150 (0)	14 (0)	34,079	414,19	112,28	438,32	3078,7	1478,0
18	9,0 (+2)	8,0 (0)	150 (0)	14 (0)	30,280	–	–	509,64	6480,0	6011,2
19	5,0 (0)	0 (-2)	150 (0)	14 (0)	31,798	405,13	112,43	–	3510,5	1415,9
20	5,0 (0)	16,0 (+2)	150 (0)	14 (0)	33,602	406,61	113,58	523,90	9381,9	9374,4
21	5,0 (0)	8,0 (0)	120 (-2)	14 (0)	31,897	307,66	112,51	448,06	4414,0	2816,0
22	5,0 (0)	8,0 (0)	190 (+2)	14 (0)	31,715	420,84	112,34	504,87	5702,2	3356,4
23	5,0 (0)	8,0 (0)	150 (0)	2 (-2)	32,745	308,28	112,95	444,62	–	–
24	5,0 (0)	8,0 (0)	150 (0)	28 (+2)	31,989	388,78	111,69	492,67	3858,8	2633,4
25	5,0 (0)	8,0 (0)	150 (0)	14 (0)	30,166	325,47	112,51	–	3337,3	2192,2
26	5,0 (0)	8,0 (0)	150 (0)	14 (0)	30,505	343,91	113,14	456,36	6820,5	–
27	5,0 (0)	8,0 (0)	150 (0)	14 (0)	31,977	359,87	113,22	447,69	4023,3	2774,4

^a Número de experimentos en el diseño.

^b Nanomer[®] I.44P.

^c Valores codificados para las variables.

^d Datos faltantes o excluidos.

El análisis de regresión por PLSR de este segundo diseño experimental fue validado por ANOVA (ver tabla A.2, Anexo A) y para obtener una distribución simétrica (gaussiana) en las respuestas y llevarlas a una distribución normal, algunas respuestas y de los datos experimentales se transformaron matemáticamente, incluyendo transformación logarítmica,

lineal, potencia, etc., así la eficiencia del análisis de los datos se mejora, aumentando la validez y confiabilidad del modelo.

A pesar que en la matriz de datos hay respuestas que poseen datos perdidos, la ventaja de PLSR es que maneja eficientemente este problema, incluso teniendo hasta un 10 % de datos extraviados, a diferencia de MLR [109].

Tabla 4.7. Evaluación del modelo obtenido por PLSR (tras 4 PLS-componentes) para la optimización de síntesis de nanocompuestos de PEBD/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido.

Parámetro del modelo	Respuesta						Total
	d_{001}	$T_{0,05}$	T_m	E	G''	G'	
R^2	0,6126	0,6822	0,6095	0,9392	0,8192	0,9478	0,768
Q^2	0,1773	0,3134	0,3452	0,7801	0,6614	0,7732	0,501
Validez del modelo	0,9371	0,6724	0,9023	0,7867	0,9988	0,9101	
Reproducibilidad	0,1388	0,8466	0,3131	0,9698	0,8550	0,8788	
Número de condición							3,7361

La tabla 4.7 muestra que después de 4 PLS-componentes, el modelo de regresión total es de $R^2 = 0,768$ y $Q^2 = 0,501$. Estos valores de correlación se consideran muy buenos teniendo en cuenta que se están calibrando seis respuestas diferentes al mismo tiempo ($p < 0,05$), y además presenta los valores R^2 individuales para cada respuesta con un rango de R^2 de 0,610 a 0,948, y un rango de Q^2 de 0,177 a 0,780 lo que nos da un fuerte indicio de que el modelo se ajusta bien y es confiable.

La figura 4.6 muestra el modelo PLS para cada respuesta al graficar los valores predichos por el modelo PLSR versus los valores experimentales obtenidos. Se puede observar que para las respuestas de las propiedades reológicas y mecánicas (ver figura 4.6d, 4.6e y 4.6f) se aprecia un ajuste del modelo de R^2 mayor a 0,82. En el caso de las respuestas para las propiedades térmicas y morfológicas (ver figura 4.6a, 4.6b 4.6c) el ajuste del modelo es menor y muestran R^2 mayores a 0,61. Estos valores de ajuste de modelo son satisfactorios considerando que es una calibración simultánea de cuatro variables con seis respuestas distintas.

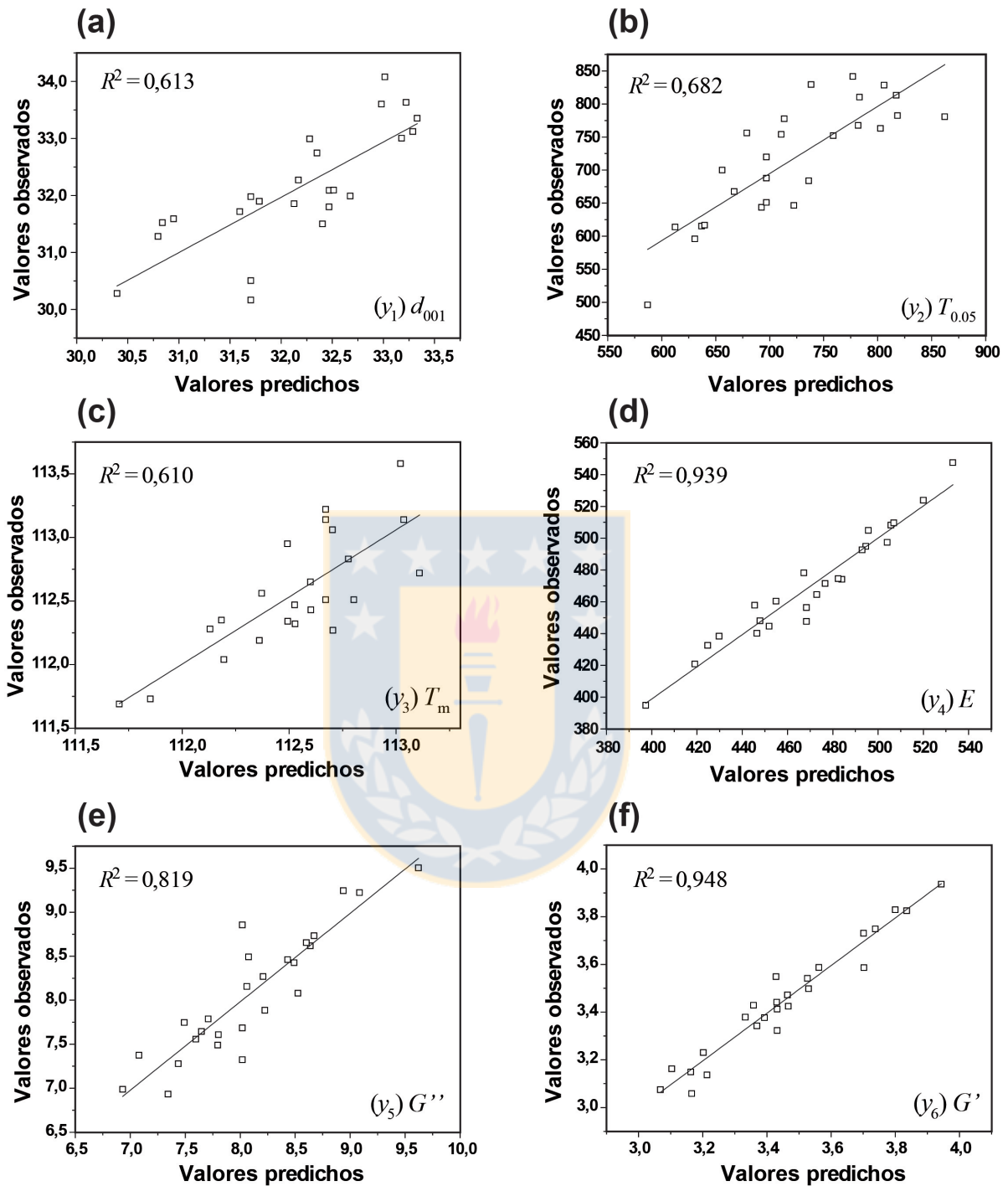


Figura 4.6. Gráficos de valores observados vs. valores predichos de las respuesta modeladas tras 4 PLS-componentes para en análisis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM. (a) y_1 distancia interlamilar d_{001} , (b) y_2 temperatura de descomposición $T_{0,05}$ con transformación lineal $2y$, (c) y_3 temperatura de fusión T_m , (d) y_4 módulo de Young E , (e) y_5 módulo de pérdida G'' , con transformación $y^{0,25}$, y (f) y_6 módulo de almacenamiento G' con transformación $\log(y)$.

El diseño de experimento utilizado es central compuesto y por tanto el modelo de regresión que nos da puede sostener términos de interacción y además términos cuadráticos (ver ecuación (5)) que permiten detectar curvaturas en las respuestas medidas.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2 \quad (5)$$

El modelo PLSR que finalmente se obtuvo tras refinación se muestra en la tabla 4.8. Aquí se aprecia que la interacción entre la %Arcilla y %Comp (x_1x_2) es significativa para la exfoliación del nanocompuesto, y que hay términos cuadráticos importantes para %Comp y t_{mix} que indican curvaturas con máximos y mínimos en estas respuestas.

Una de las ventajas de PLSR es que los datos pueden ser interpretados por un lado como calibración multivariada (MLR), pero también puede analizarse como si se tratara de análisis de componentes principales (PCA) utilizando gráficos de *scores* y gráficos de *loadings*.

Tabla 4.8. Coeficientes de regresión normalizados (*b*) calculados mediante PLSR (tras 4 PLS-componentes) para la optimización de síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM mediante mezclado en estado fundido.

Término del polinomio	y_1 distancia interlaminar d_{001}	y_2 temperatura de descomposición $T_{0.05}$	y_3 temperatura de fusión T_m	y_4 módulo de Young E	y_5 módulo de pérdida G''	y_6 módulo de almacenam. G'
constante b_0	$30,56 \pm 0,23^a$ $p = 0,000$	$7,939 \pm 0,220$ $p = 0,000$	$239,89 \pm 0,23$ $p = 0,000$	$13,30 \pm 0,09$ $p = 0,000$	$11,20 \pm 0,17$ $p = 0,000$	$13,81 \pm 0,09$ $p = 0,000$
b_1 %Arcilla	$-0,607 \pm 0,134$ $p = 0,000$	$-0,595 \pm 0,127$ $p = 0,000$	$0,550 \pm 0,132$ $p = 0,001$	$0,525 \pm 0,053$ $p = 0,000$	$0,414 \pm 0,096$ $p = 0,000$	$0,543 \pm 0,050$ $p = 0,000$
b_2 %Comp.	$0,120 \pm 0,134$ $p = 0,384$	$0,094 \pm 0,127$ $p = 0,467$	$0,217 \pm 0,132$ $p = 0,116$	$0,657 \pm 0,053$ $p = 0,000$	$0,699 \pm 0,096$ $p = 0,000$	$0,727 \pm 0,050$ $p = 0,000$
b_3 T_{mix}	$-0,052 \pm 0,134$ $p = 0,704$	$0,420 \pm 0,127$ $p = 0,004$	$-0,177 \pm 0,132$ $p = 0,195$	$0,355 \pm 0,053$ $p = 0,000$	$0,257 \pm 0,096$ $p = 0,014$	$0,174 \pm 0,050$ $p = 0,003$
b_4 t_{mix}	$0,023 \pm 0,135$ $p = 0,868$	$0,231 \pm 0,127$ $p = 0,086$	$-0,340 \pm 0,133$ $p = 0,019$	$0,291 \pm 0,053$ $p = 0,000$	$0,099 \pm 0,096$ $p = 0,318$	$0,071 \pm 0,051$ $p = 0,177$
b_{22} %Comp. \times %Comp.	$0,228 \pm 0,125$ $p = 0,082$	$0,269 \pm 0,118$ $p = 0,034$	$0,069 \pm 0,122$ $p = 0,577$	$0,020 \pm 0,049$ $p = 0,683$	$0,181 \pm 0,089$ $p = 0,056$	$0,129 \pm 0,047$ $p = 0,013$
b_{44} $t_{mix}\times t_{mix}$	$0,197 \pm 0,135$ $p = 0,160$	$-0,066 \pm 0,127$ $p = 0,608$	$-0,296 \pm 0,132$ $p = 0,038$	$0,019 \pm 0,053$ $p = 0,732$	$-0,104 \pm 0,096$ $p = 0,290$	$-0,060 \pm 0,051$ $p = 0,249$
b_{12} %Arcilla \times %Comp.	$0,477 \pm 0,158$ $p = 0,007$	$-0,224 \pm 0,149$ $p = 0,149$	$-0,131 \pm 0,155$ $p = 0,407$	$-0,129 \pm 0,063$ $p = 0,053$	$-0,080 \pm 0,113$ $p = 0,485$	$0,014 \pm 0,059$ $p = 0,815$

^a Coeficiente de regresión normalizado \pm error estándar, incluido el valor de *p*.

La figura 4.7 muestra como funciona PLSR. Este método crea nuevas variables llamadas *x-scores* denotados por t_a (a = numero del PLS-componentes) como combinaciones de las variables x originales. Las respuestas y son similarmente combinadas para dar nuevos *y-scores* denotados por u_a (a = numero del PLS-componentes) como se muestra en figura 4.7a y 4.7b. Estos nuevos *scores* se relacionan para maximizar la correlación entre ambas x e y (ver figura 4.7c). En los gráficos de *scores* se puede observar como los experimentos se correlacionan, mostrando sus similitudes y diferencias, y si hay experimentos *outliers* que deban examinarse o eliminarse.

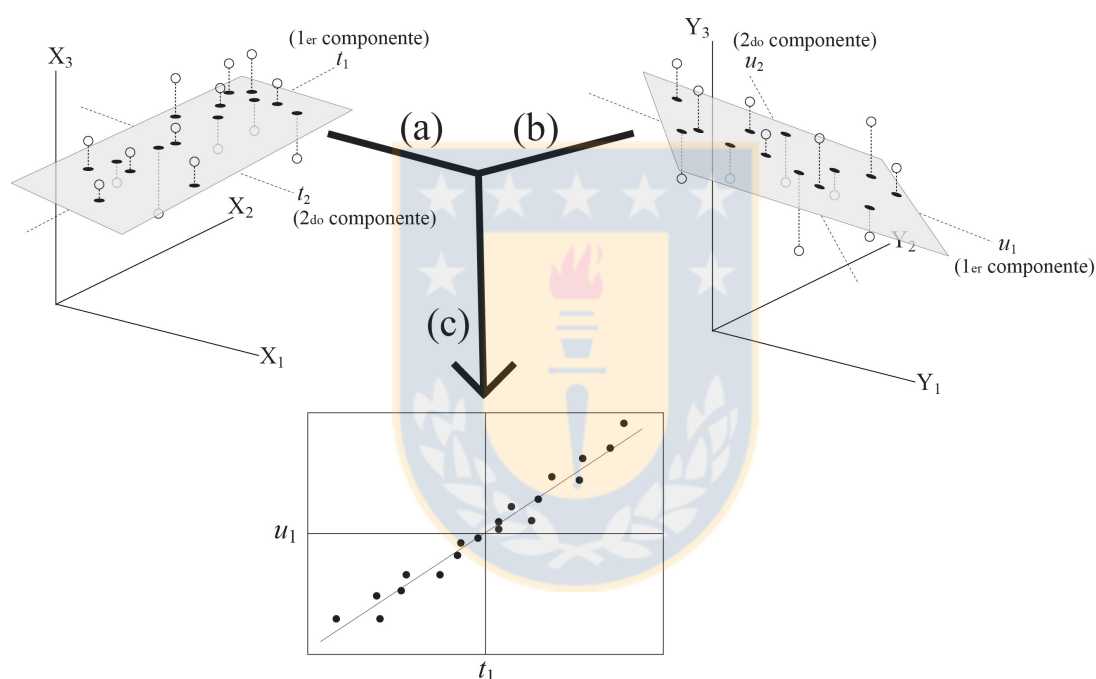


Figura 4.7. Representación geométrica de PLSR. (a) Proyecciones (círculos negros) de las nuevas variables t obtenidas del espacio x -variables en un nuevo PLS-componente. El número de ejes X es el número de x variables del experimento. (b) Proyecciones de las nuevas variables u obtenidas del espacio y -respuestas en un nuevo PLS-componente. El número de ejes Y es el número de y respuestas medidas en el experimento. (c) Gráfico relacionando las nuevas coordenadas t y u en un PLS-componente dado.

En la figura 4.8 se observan los gráficos de *scores* u vs. t para cada PLS-componente. Una línea diagonal de regresión de los datos que pasa por el origen indica que las variables x se correlacionan muy bien con las respuestas y , indicando que las variables tienen mucha influencia en las respuestas medidas y que útil información puede ser extraída de estos componentes. El gráfico 4.8a muestra los *scores* del primer componente los cuales se alinean

con un $R^2 = 0,941$, indicando que no hay experimentos *outliers* en el modelo, y que hay una excelente correlación. El gráfico de *scores* del segundo componente aun muestra buena correlación, y los del tercer y cuarto PLS-componente ya muestran cierta dispersión (ver figuras 4.8b, 4.8c y 4.8d).

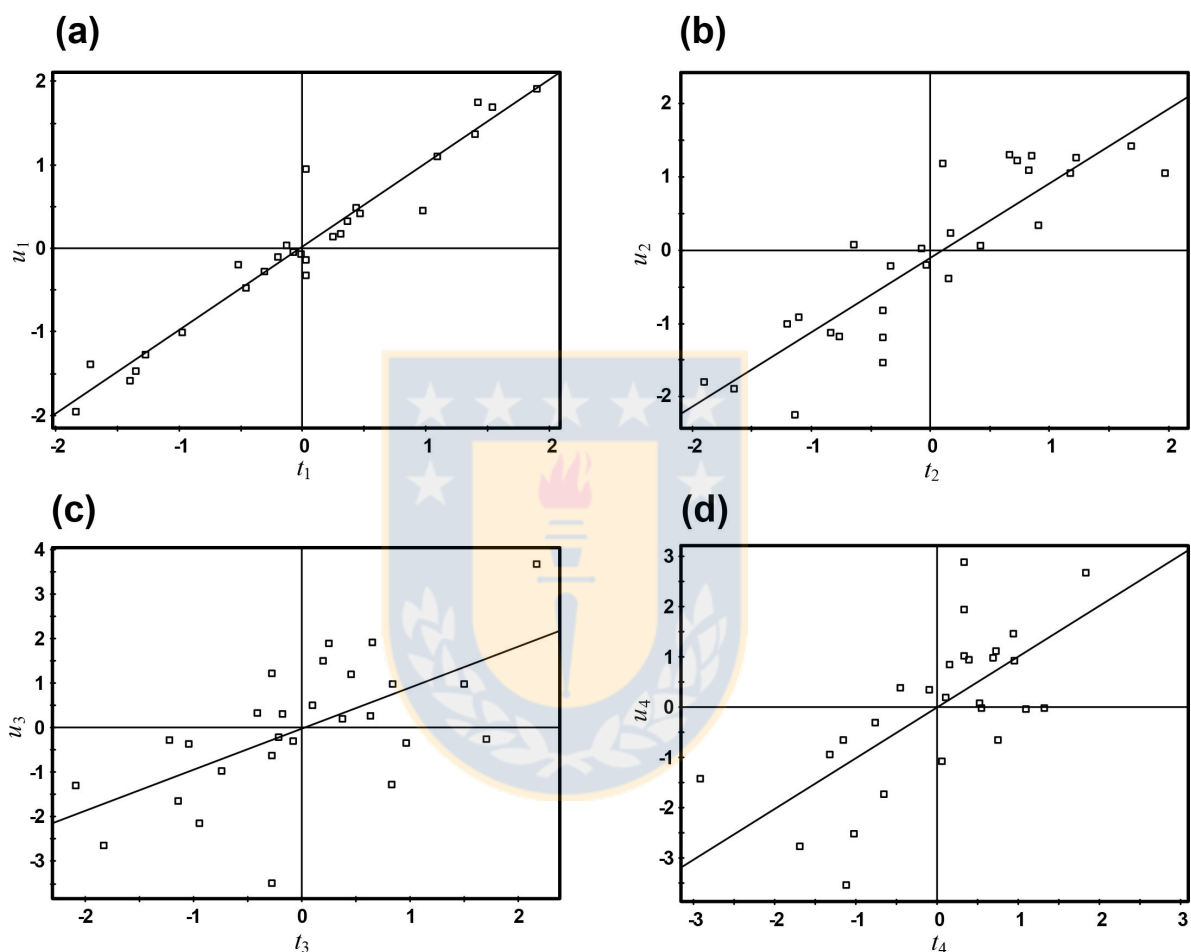


Figura 4.8. Gráficos de *scores* u vs. t obtenidos por PLSR para el segundo diseño experimental CCC en cada PLS-componente, (a) primer PLS-componente $R^2 = 0,941$, (b) segundo PLS-componente $R^2 = 0,774$, (c) tercer PLS-componente $R^2 = 0,397$, y (d) cuarto PLS-componente $R^2 = 0,467$. Cada punto en el gráfico es un experimento del diseño.

Por otro lado, se puede obtener información de los gráficos de *loadings*, el cual muestra un resumen de la relación entre las variables y las respuestas a través de los x -weights y los y -weights (w y c) de un PLS-componente frente a otro, graficando todas las variables y las respuestas al mismo tiempo mostrando así sus interrelaciones. En la figura 4.9 se muestra el

gráfico de *loadings* que relaciona el primer y segundo PLS-componente (w_1c_1 vs. w_2c_2). Cuando una variable o interacción está lejos del origen del gráfico significa que tiene un gran impacto en las respuestas, y mientras más cerca del origen del gráfico, menor es su impacto. Entre las variables estudiadas, t_{mix} muestra el menor impacto, y las variables %Arcilla y %Comp poseen las mayores influencias en las respuestas. Si una variable o interacción está cerca de una respuesta en el gráfico de *loadings*, significa que están relacionadas positivamente. El %Arcilla está fuertemente relacionada positivamente con la respuesta T_m (ver gráfico 4.9) ya que se encuentran muy cerca una de otra, en el mismo cuadrante del gráfico, por lo que poseen el mismo signo, entonces cuando %Arcilla aumenta, T_m aumenta su valor. En el caso de %Comp, este se agrupa cerca de las respuestas reológicas y mecánicas por lo que influye positivamente en éstas.

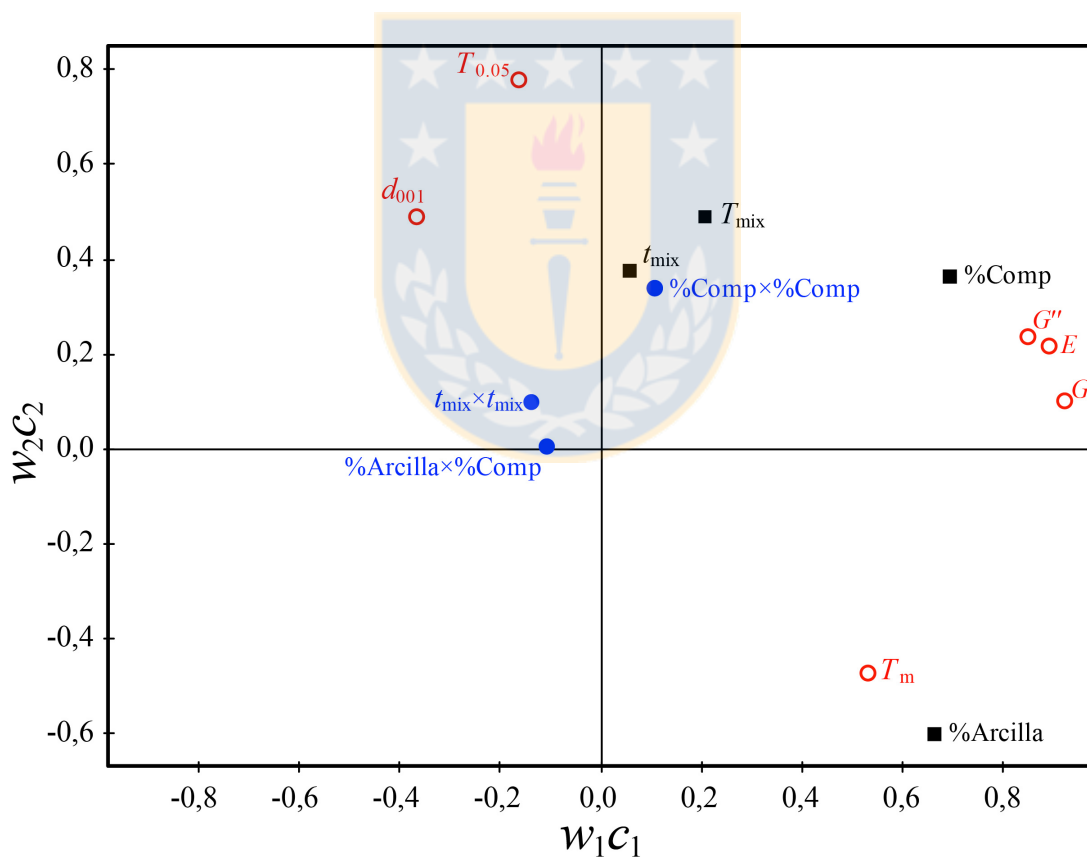


Figura 4.9. Gráfico de *loadings* del segundo diseño de experimentos obtenido por PLSR: *loadings* del primer componente (w_1c_1) vs. *loadings* del segundo componente (w_2c_2), correlacionando cuatro variables (■), tres interacciones entre variables (●) y seis respuestas (○).

Para tener una mejor apreciación de la información que entrega el gráfico de *loadings*, se puede trazar una línea a partir de una respuesta pasando por el origen del gráfico (ver figura 4.10). Desde cada variable e interacción se trazan proyecciones perpendiculares hacia esta línea. Cuando la intersección entre estas líneas se aleja del origen del gráfico, más importante es esta variable para la respuesta evaluada.

Por ejemplo, %Arcilla y T_{mix} son las variables que más influyen en $T_{0.05}$, pero de forma contraria (ver figura 4.10b). El intercepto de T_{mix} en la línea de respuesta de $T_{0.05}$ está en el mismo cuadrante de la respuesta $T_{0.05}$, por lo tanto están correlacionadas positivamente: a mayor T_{mix} mayor valor de $T_{0.05}$, pero en el caso de %Arcilla, su intersección está en el cuadrante contrario, por lo que están correlacionadas negativamente: a mayor %Arcilla menor valor de $T_{0.05}$. En el caso de la respuesta G' (ver figura 4.10f) las interacciones $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ y %Arcilla \times %Comp no son influyentes ya que el intersección de sus proyecciones están muy cercas del origen del gráfico.

Este gráfico de *loadings* debe interpretarse a la par con el gráfico de coeficientes (ver figura 4.11). La poca influencia de $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ y %Arcilla \times %Comp en la respuesta G' puede corroborarse con los pequeños valores de los coeficientes de regresión b_{44} y b_{12} que se muestran en el gráfico de coeficientes. Utilizando el mismo análisis, para la respuesta $T_{0.05}$ se observa en el gráfico de coeficientes que %Arcilla y T_{mix} (b_1 y b_3) son coeficientes grandes pero de signo contrario. En la figura 4.9 se observa que E , G'' y G' forman un *cluster* lo que indica que son respuestas fuertemente correlacionadas, y por tanto debieran poseer similares perfiles de coeficientes, lo cual se puede corroborar al examinar sus respectivos gráficos de coeficientes los cuales presentan similares magnitudes e igual signo. Por otro lado, d_{001} y T_m están en coordenadas opuestas en el gráfico de *loadings* por tanto sus perfiles de coeficientes debieran ser completamente contrarios (ver figura 4.11).

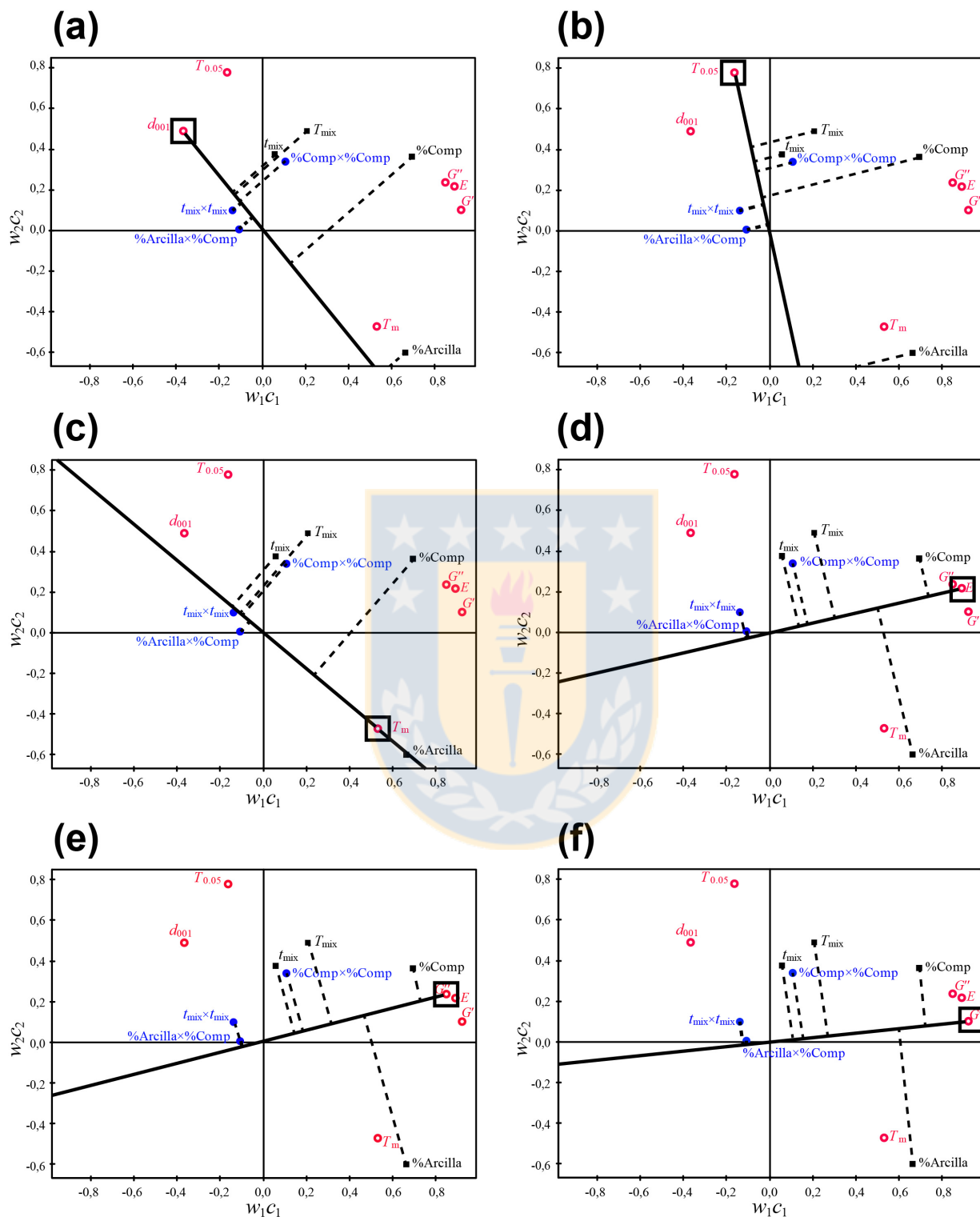


Figura 4.10. Interpretación del gráfico de *loadings* por PLSR para cada respuesta: *loadings* del primer componente (w_1c_1) vs. *loadings* del segundo componente (w_2c_2). (■) variables, (○) respuestas, e (●) interacciones entre variables.

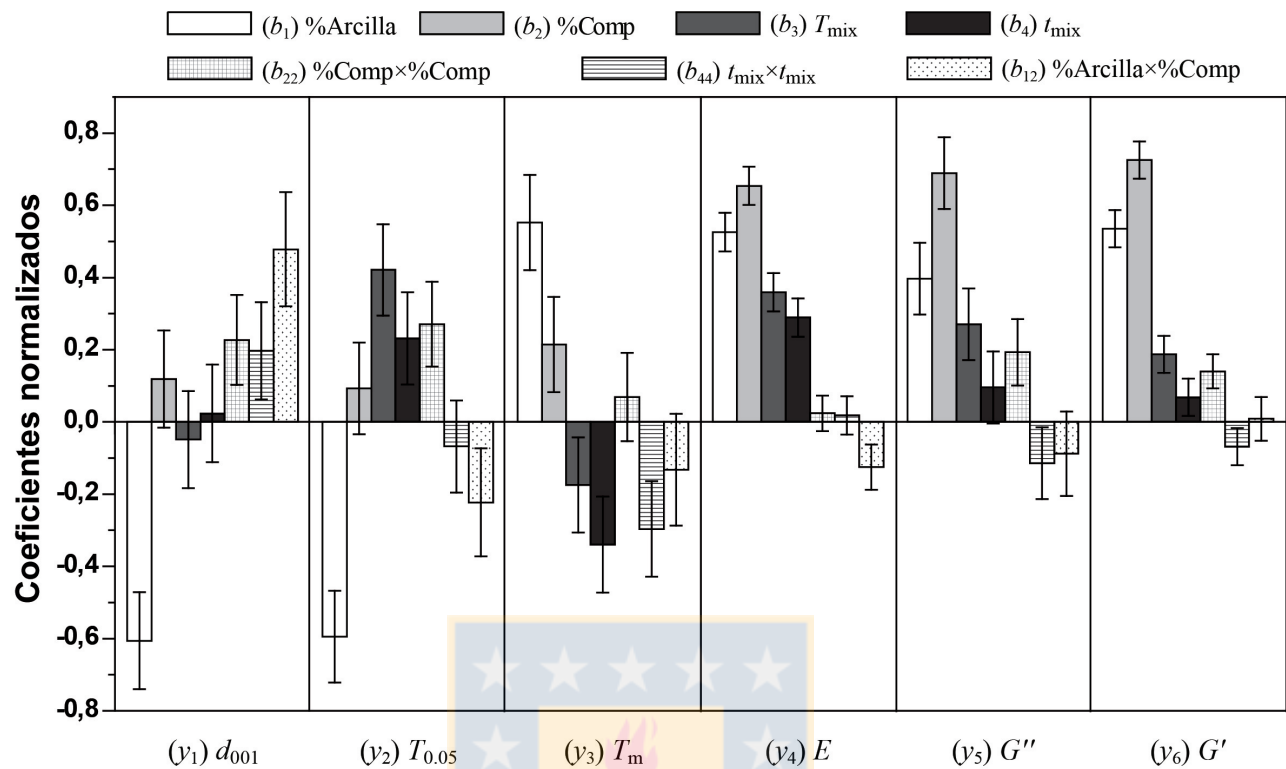


Figura 4.11. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos tras 4 PLS-componentes para las variables individuales y las interacciones entre variables para cada respuesta del segundo diseño experimental CCC.

Del análisis del gráfico de coeficientes se observa que para la respuesta d_{001} la interacción %Arcilla×%Comp tiene un alto impacto, pero esto no se ve reflejado en el gráfico de *loadings* (ver figura 4.9). Esta información se encuentra en el gráfico de *loadings* del primer y tercer componente los cuales tampoco se deben ignorar (ver figura 4.12a). Aquí se aprecia que esta interacción impacta fuertemente en d_{001} lo que se condice con la magnitud de su coeficiente.

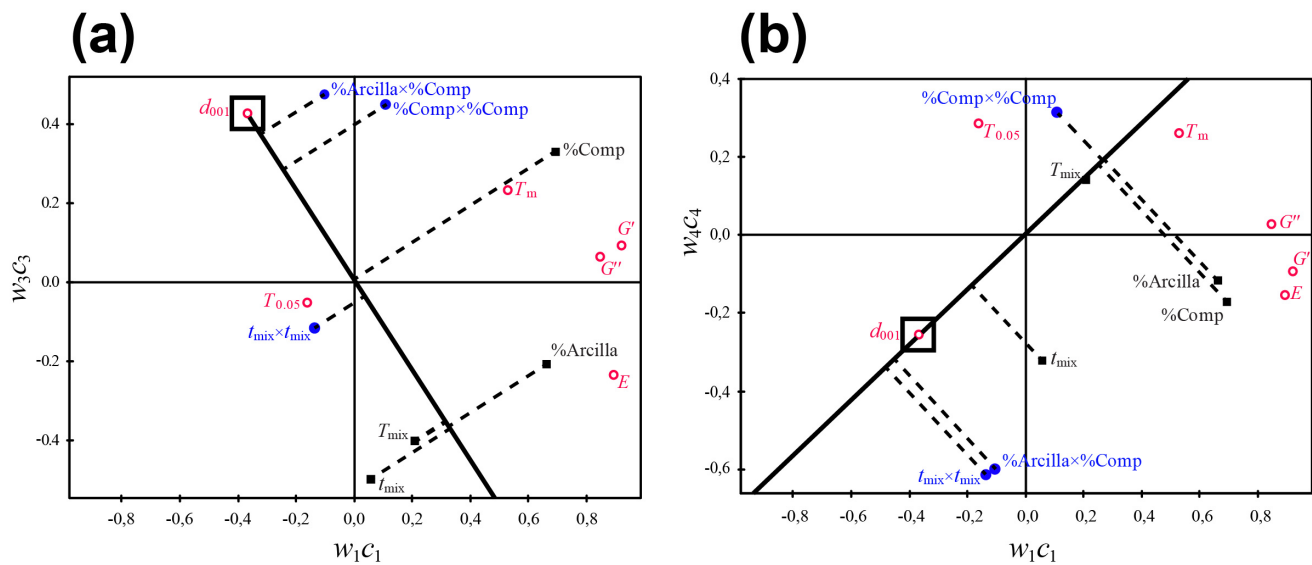


Figura 4.12. Gráficos de *loadings* obtenidos por PLSR que incluye los *loadings* del tercer (w_3c_3) y cuarto (w_4c_4) PLS-componente con cuatro variables (■), seis respuestas (○) y tres interacciones entre variables (●). (a) gráfico de *loadings* del primer y tercer PLS-componente, (b) gráfico de *loadings* del primer y cuarto PLS-componente.

Al obtener los mapas de superficie respuesta, se aprecian tres tipos de superficies de respuesta en el modelo obtenido por PLSR: lineal, cuadrática y de interacción. La respuesta de E (ver figura 4.13d) tiene una forma plana lineal por lo que no presenta interacciones ni curvaturas importantes, que se condice con en el gráfico de coeficientes al ser los coeficientes de interacción muy pequeños. En el caso de T_m y $T_{0.05}$ poseen coeficientes cuadráticos importantes (b_{44} y b_{22} respectivamente) lo que se refleja en el mapa superficie respuesta (ver figura 4.13b y 4.13c) al poseer curvatura en la respuesta lo que en la práctica significa encontrar un mínimo o un máximo en la respuesta. La superficie respuesta para d_{001} es de tipo torcida lo que implica que existe una fuerte interacción entre variables, la que en este caso es la interacción $\%Arcilla \times \%Comp$ cuyo coeficiente b_{12} es significativamente grande. Esta interacción indica que la razón Arcilla:Comp debe ser balanceada en la formulación produciendo mejores intercalaciones en la proporción 3:4 como se aprecia en la figura 4.13a.

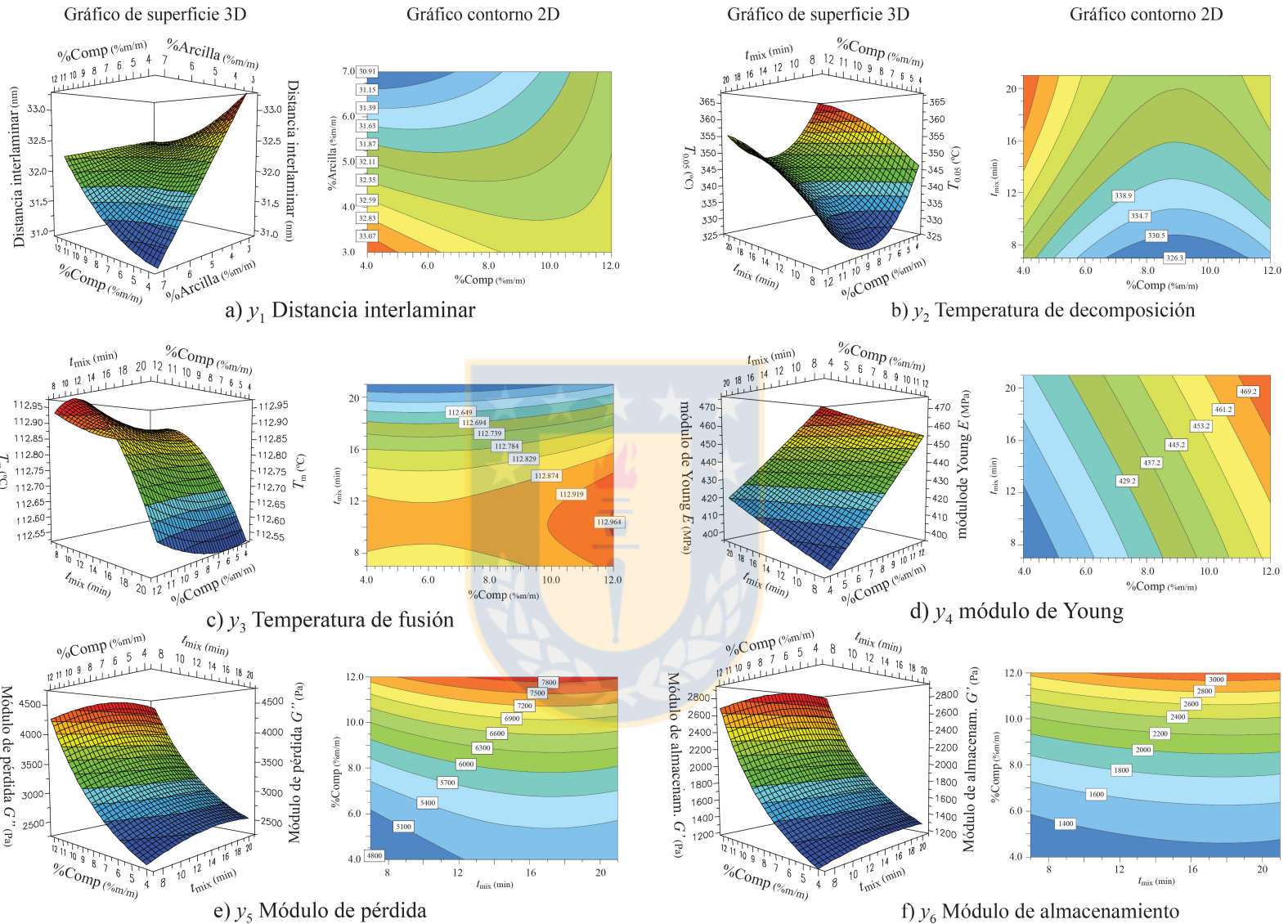


Figura 4.13. Gráficos superficie respuesta 3D y gráficos de contorno 2D para cada respuesta y obtenidos por PLSR: (a) y_1 distancia interlaminar a $T_{mix} = 130$ °C y $t_{mix} = 7$ min, (b) y_2 temperatura de descomposición a %Arcilla = 7,0 %/m y $T_{mix} = 170$ °C, (c) y_3 temperatura de fusión a %Arcilla = 7,0 %/m y $T_{mix} = 170$ °C, (d) y_4 módulo de Young a %Arcilla = 3,0 %/m y $T_{mix} = 130$ °C, (e) y_5 módulo de pérdida a %Arcilla = 3,0 %/m y $T_{mix} = 130$ °C, y (f) y_6 módulo de almacenamiento = 3,0 %/m y $T_{mix} = 130$ °C.

El uso de estos films de nanocompuestos como material de carga de componentes volátiles de aceites esenciales para su uso como empaque activo propone el desafío de cargar este material en la síntesis a altas temperaturas con sustancias altamente volátiles, lo que restringe el uso de temperaturas de mezclado demasiado altas por tiempos muy prolongados, lo que conllevaría a la pérdida excesiva de principio activo por volatilización. Tras el análisis de los gráficos de *scores*, *loadings*, coeficientes y mapas de respuesta se pudo optimizar las condiciones de proceso y la formulación de los nanocompuestos de PEBD/MOM, obteniendo las mejores características morfológicas, mecánicas, térmicas y reológicas para este objetivo, las cuales tras optimización por método SIMPLEX [115] fueron: %Arcilla = 3,1 %m/m Nanomer[®] I.44P, %Comp. = 4,0 %m/m, $T_{mix} = 130\text{ °C}$, $t_{mix} = 7\text{ min}$, y $v_{mix} = 50\text{ rpm}$. El análisis morfológico por AFM de esta formulación (ver figura 4.14c) muestra una superficie suave de tipo laminar que indica un alto grado de intercalación con un $d_{001} = 33,12\text{ nm}$, a diferencia de una formulación con menor grado de intercalación (ver figura 4.14d) con un $d_{001} = 30,17\text{ nm}$ que presenta una topología irregular y rugosa. La d_{001} de la nanoarcilla sola Nanomer[®] I.44P es de 26,31 nm por lo que el grado de intercalación en la formulación optimizada es alta [116, 117].

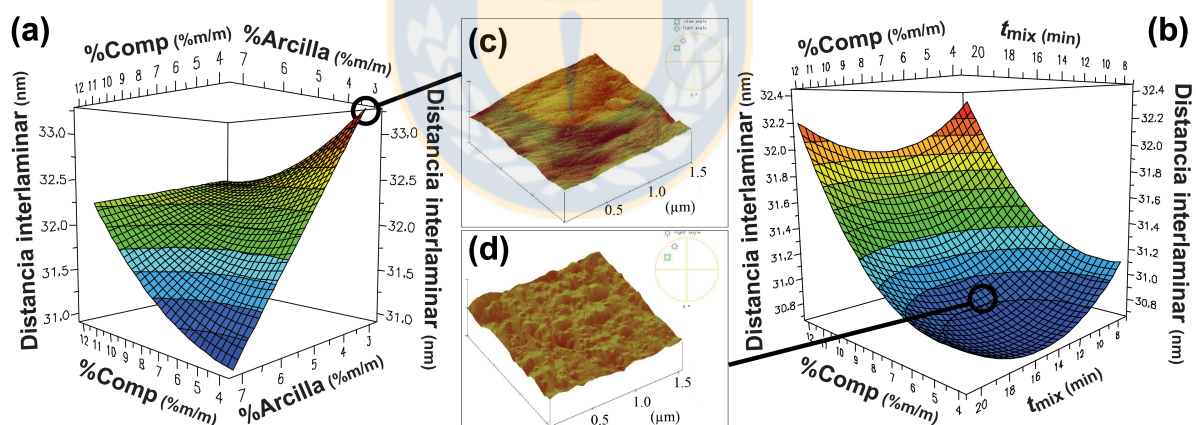


Figura 4.14. (a) y (b) Mapas superficie respuesta para distancia interlamina d_{001} . Micrografías AFM de nanocompuestos de PEBD/MOM con (c) %Arcilla = 3,0 %m/m de Nanomer[®] I.44P, %Comp. = 4,0 %m/m, $T_{mix} = 130\text{ °C}$, $t_{mix} = 7\text{ min}$, y $v_{mix} = 50\text{ rpm}$. (d) %Arcilla = 5,0 %m/m de Nanomer[®] I.44P, %Comp. = 8,0 %m/m, $T_{mix} = 150\text{ °C}$, $t_{mix} = 14\text{ min}$, y $v_{mix} = 50\text{ rpm}$.

4.1.3. Optimización de las propiedades de empaque de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión: primer diseño de experimentos.

Con el fin de optimizar las condiciones de síntesis y la formulación de bionanocompuestos de ATP/MOM como potencial material de empaque con carga de principios activos volátiles, se evaluó de manera preliminar las condiciones de extrusión y las variables más importantes en la formulación. Para esto se realizó un primer diseño de experimentos factorial completo (FFD) de dos niveles 2^x (x = número de variables) como *screening*, en el cual se incluyeron cuatro variables: x_1 la concentración de nanoarcilla en la formulación (%Arcilla), x_2 la velocidad de giro de los husillos en el mezclado (v_{mix}), x_3 la proporción de plastificante en la formulación (%Plastif.), y x_4 la temperatura de mezclado en la extrusión (T_{mix}).

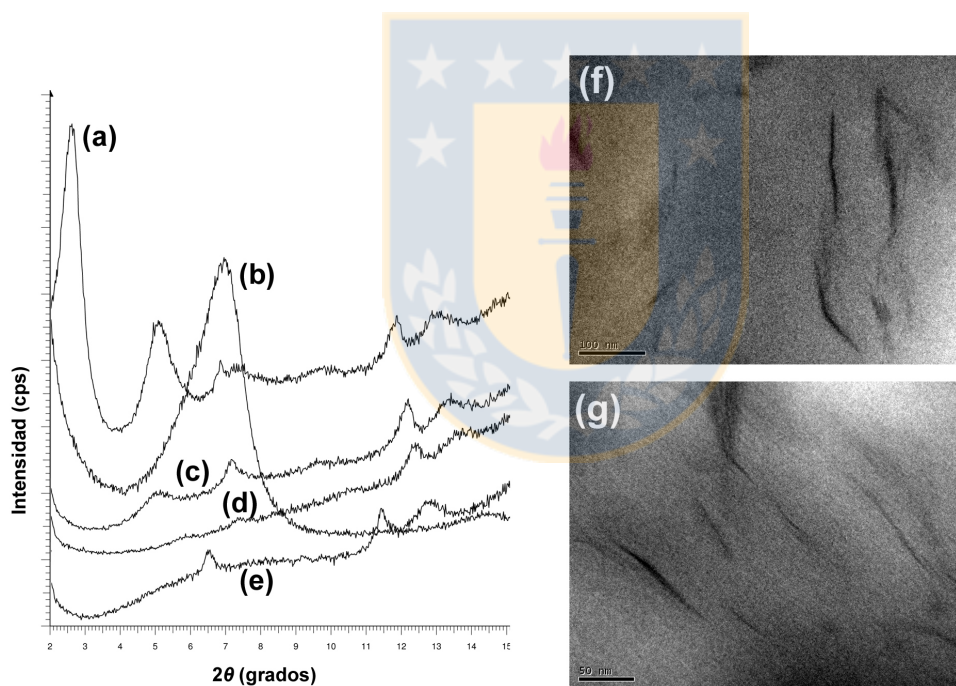


Figura 4.15. A la izquierda: difractogramas por DRX (a) bionanocompuestos de ATP/Nanomer[®] I.30E (octadecilamina) al 5 %m/m $d_{001} = 34,10$ nm, (b) Nanomer[®] montmorillonita sódica sola $d_{001} = 12,67$ nm, (c) bionanocompuestos de ATP/Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina) al 5 %m/m d_{001} = exfoliada, (d) bionanocompuestos de ATP/Nanomer[®] montmorillonita sódica al 5 %m/m d_{001} = exfoliada, (e) ATP sin nanoarcilla. A la derecha: microfotografías TEM de bionanocompuestos ATP/MOM con (g) Nanomer[®] I.34TCN al 5 %m/m, (f) Nanomer[®] montmorillonita sódica al 5 %m/m.

Estudios preliminares de bionanocompuestos por DRX utilizando glicerina:agua (50:50) como plastificante, mostraron que entre varias nanoarcillas organomodificadas utilizadas, las nanoarcilla montmorillonita hidrofílica sódica y Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina) mostraron niveles de intercalación y exfoliación satisfactorios corroborados por DRX y microscopía TEM (ver figura 4.15) en donde se puede observar, por ejemplo, el corrimiento del espacio basal d_{001} de la nanoarcilla no modificada hacia ángulo menores a $2^\circ 2\theta$ lo que indica que se produce exfoliación, siendo esto apoyado por las imágenes de TEM que muestran la separación de las láminas de arcilla. Reportes previos de estudios de la intercalación y la exfoliación de arcillas con almidón termoplastificado [118] muestran resultados similares, esto debido a que la naturaleza hidrofílica del almidón termoplastificado hace que sea muy afín a la nanoarcilla no modificada o la que posee sustituyentes menos apolares, como el caso de la Nanomer[®] I.34TCN, que posee grupos hidroxilos en su estructura (ver figura 1.6b).

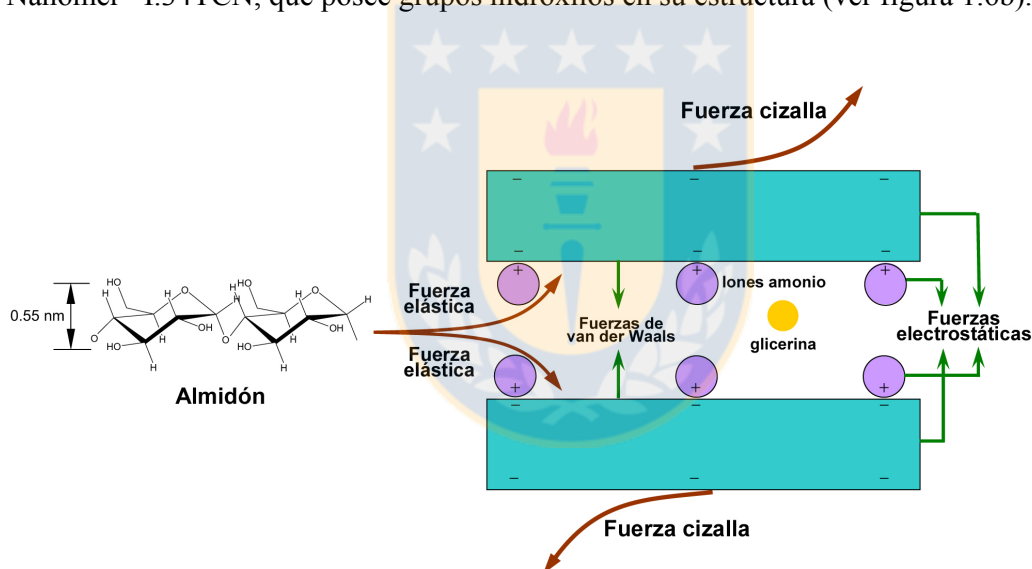


Figura 4.16. Proceso de intercalación de almidón en nanoarcillas [119].

La interacción que conlleva a la intercalación del almidón en la nanoarcilla no modificada se debe a los grupos hidroxilo del almidón los que interactúan directamente con los iones sodio presentes en las galerías de la nanoarcilla. Por otro lado, los grupos hidroxilos de los bordes de la nanoarcilla también pueden interaccionar con los hidroxilos del almidón. El hecho de que también hayan buenos niveles de intercalación con la Nanomer[®] I.34TCN se debe a que los alquilamonios menos apolares que poseen grupos hidroxilos también pueden interaccionar con los hidroxilos del almidón permitiendo el ingreso a las galerías (ver figura 4.16).

Basándose en los resultados preliminares, para este primer estudio multivariado se utilizó la nanoarcilla no modificada (Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica), y el plastificante a evaluar fue una mezcla 50:50 de glicerina:agua. La extrusora utilizada posee cuatro zonas de calentamiento a lo largo de los husillos: la primera zona (entrada para alimentación) que se fijó en 70 °C, la segunda zona de precalentamiento que se mantuvo en 90 °C, y la tercera y cuarta zona son las que se evaluó como temperatura de mezclado (T_{mix}) para el estudio. Los niveles a los cuales se estudiaron estas cuatro variables se detalla en la tabla 4.9.

Tabla 4.9. Primer diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles (2^4) para la síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.

	x_1 %Arcilla ^a (%/m/m)	x_2 Velocidad de mezcla v_{mix} (rpm)	x_3 %Plastificante ^b (%/m/m)	x_4 Temperatura de mezcla ^c T_{mix} (°C)
Puntos centrales (0) ^d	4,0	75	35,0	100
Puntos de esquina (-1/1)	3,0 / 5,0	50 / 100	30,0 / 40,0	90 / 110

^a Nanomer[®] montmorillonita hidrofílica sódica.

^b Proporción 50:50 glicerina:agua.

^c Temperatura de la tercera y cuarta zona de los tornillos. Primera zona fijada en 70 °C; segunda zona fijada en 90 °C.

^d Valores en paréntesis son los valores codificados de los niveles de las variables: (-1) = nivel menor de punto esquina, (0) = nivel central, (1) = nivel mayor de punto esquina.

En la tabla 4.10 se presenta el diseño experimental de manera detallada, el cual constó de $2^4 = 16$ experimentos más el punto central en triplicado, dando un total de 19 experimentos. Las respuestas experimentales que se midieron fueron como propiedad morfológica, la distancia interlamina (d_{001}), como propiedad térmica, la temperatura de descomposición ($T_{0,10}$), y como propiedad mecánica, el módulo de Young (E).

Este primer diseño experimental *screening* permitió obtener un modelo matemático para establecer la relación existente entre las cuatro variables x y las tres propiedades y medidas experimentalmente. Esto se llevó a cabo por PLSR obteniendo una ecuación polinomial como la presentada en la ecuación (2), la cual de acuerdo al diseño utilizado tiene la forma de una ecuación de segundo orden con interacciones.

La tabla 4.11 muestra los parámetros de evaluación del modelo obtenido por PLSR. Se aprecia que la calibración total de las tres respuestas con las cuatro variables estudiadas arroja un $R^2 = 0,8333$ y un $Q^2 = 0,5973$ tras 3 PLS-componentes, lo que se considera satisfactorio y proporciona confiabilidad al momento de evaluar e interpretar los resultados a partir de este

modelo. El modelo refinado que se postula (ver ecuación (6)) muestra para cada respuesta una muy buena correlación y un poder predictivo satisfactorio.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{23}x_2x_3 \quad (6)$$

Tabla 4.10. Datos experimentales del primer diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles (2^4) para la síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.

Exp ^a	Variables				Respuestas		
	x_1 %Arcilla ^b (%m/m)	x_2 v_{mix} (rpm)	x_3 %Plastif. ^c (%m/m)	x_4 T_{mix} ^d (°C)	y_1 d_{001} (nm)	y_2 $T_{0,10}$ (°C)	y_3 E (MPa)
1	3,0 (-1) ^c	50 (-1)	30 (-1)	90 (-1)	17,410	130,29	216,40
2	5,0 (+1)	50 (-1)	30 (-1)	90 (-1)	17,340	141,01	170,50
3	3,0 (-1)	100 (+1)	30 (-1)	90 (-1)	16,728	150,30	172,00
4	5,0 (+1)	100 (+1)	30 (-1)	90 (-1)	16,773	139,21	139,75
5	3,0 (-1)	50 (-1)	40 (+1)	90 (-1)	17,661	144,95	– ^f
6	5,0 (+1)	50 (-1)	40 (+1)	90 (-1)	17,297	126,30	87,95
7	3,0 (-1)	100 (+1)	40 (+1)	90 (-1)	16,968	103,98	–
8	5,0 (+1)	100 (+1)	40 (+1)	90 (-1)	17,400	111,00	–
9	3,0 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	110 (+1)	17,814	180,27	273,00
10	5,0 (+1)	50 (-1)	30 (-1)	110 (+1)	18,205	166,16	333,20
11	3,0 (-1)	100 (+1)	30 (-1)	110 (+1)	–	162,30	237,6
12	5,0 (+1)	100 (+1)	30 (-1)	110 (+1)	17,530	162,63	211,60
13	3,0 (-1)	50 (-1)	40 (+1)	110 (+1)	17,468	–	115,40
14	5,0 (+1)	50 (-1)	40 (+1)	110 (+1)	18,359	165,88	93,40
15	3,0 (-1)	100 (+1)	40 (+1)	110 (+1)	18,388	157,07	81,96
16	5,0 (+1)	100 (+1)	40 (+1)	110 (+1)	18,322	–	82,18
17	4,0 (0)	75 (0)	35 (0)	100 (0)	17,829	141,64	97,48
18	4,0 (0)	75 (0)	35 (0)	100 (0)	–	150,88	91,05
19	4,0 (0)	75 (0)	35 (0)	100 (0)	17,447	143,88	109,98

^a Número de experimentos en el diseño.

^b Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

^c Proporción 50:50 glicerina:agua.

^d Temperatura de la tercera y cuarta zona de los tornillos. Primera zona: 70 °C; segunda zona: 90 °C.

^e Valores codificados para las variables.

^f Datos faltantes o excluidos.

Los coeficientes de regresión y sus significancias estadísticas se detallan en la tabla 4.12 y se aprecian visualmente en el gráfico de coeficientes en la figura 4.19. La significancia estadística del modelo polinomial PLSR para cada respuesta se detalla en la tabla A.3 (ver Anexo A), en donde el análisis de varianza ANOVA muestra un buen ajuste del modelo.

Tabla 4.11. Evaluación del modelo por PLSR (tras 3 PLS-componentes) para la síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.

Parámetro del modelo	Respuestas			Total
	d_{001}	$T_{0,10}$	E	
R^2	0,7878	0,8559	0,8576	0,8333
Q^2	0,5681	0,4638	0,7252	0,5973
Validez del modelo	0,8825	0,5802	0,7280	
Reproducibilidad	0,7300	0,9482	0,8955	
Número de condición				1,061

La figura 4.17 muestra el ajuste del modelo a cada respuesta y al comparar los valores medidos experimentalmente y los valores predichos por el modelo se aprecia que hay una muy buena correlación con R^2 sobre 0,78.

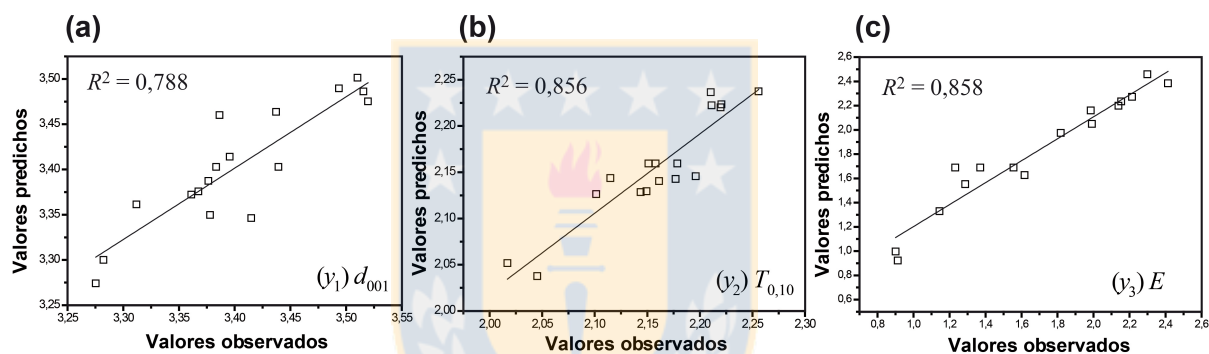


Figura 4.17. Gráfico de valores observados vs. valores predichos para cada respuesta modelada tras 3 PLS-componentes para la optimización de síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM. (a) y_1 distancia interlamina d_{001} con transformación $(y - 6)^{0,5}$ (b) y_2 temperatura de descomposición $T_{0,10}$ con transformación $\log(y)$, (c) y_3 módulo de Young E con transformación $\log(y - 74)$.

En el gráfico de *scores* u vs. t para el primer PLS componente (ver figura 4.18a) se aprecia que hay una muy buena correlación y homogeneidad en los datos experimentales. El segundo PLS componente muestra una dispersión aún aceptable y el gráfico de *scores* del último PLS-componente muestra una dispersión muy acentuada (ver figura 4.18b y 4.18c).

El modelo arroja que las variables impactan de manera significativa en las respuestas, aunque para los %Arcilla que se estudiaron (de 3 a 5 %m/m) no se aprecia mayor variación en la respuesta (ver figura 4.19) a pesar de obtenerse buenos niveles de intercalación, por lo que en un segundo estudio se evaluarían concentraciones mayores y así evaluar su impacto en las respuestas. El único término de interacción que resultó significativo ($p < 0,05$) para las tres respuestas medidas fue el de la interacción $v_{\text{mix}} \times \% \text{Plastif}$.

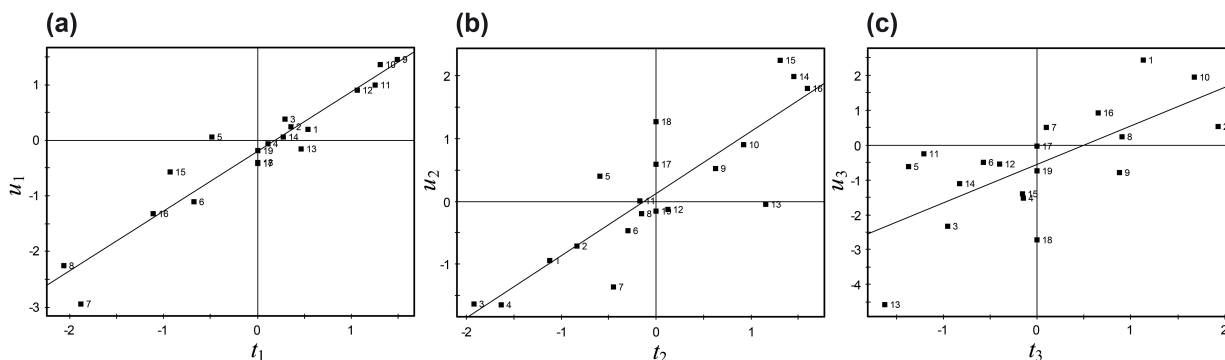


Figura 4.18. Gráficos de *scores u* vs. *t* obtenidos por PLSR para el diseño experimental FFD en cada PLS-componente, (a) primer componente $R^2 = 0,911$, (b) segundo componente $R^2 = 0,733$, (c) tercer componente $R^2 = 0,471$. Cada punto en el gráfico corresponde a un experimento del diseño.

Tabla 4.12. Coeficientes de regresión normalizados (*b*) calculados tras 3 PLS-componentes para la síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.

Términos del polinomio	y_1 distancia interlaminar d_{001}	y_2 temperatura de descomposición $T_{0,10}$	y_3 módulo de Young E
constante b_0	$44,66 \pm 0,12^a$ $p = 0,000$	$34,39 \pm 0,097$ $p = 0,000$	$3,357 \pm 0,09$ $p = 0,000$
b_1 %Arcilla	$-0,161 \pm 0,120$ $p = 0,204$	$-0,106 \pm 0,099$ $p = 0,303$	$-0,069 \pm 0,096$ $p = 0,428$
b_2 Velocidad de mezclado v_{mix}	$-0,187 \pm 0,120$ $p = 0,145$	$-0,337 \pm 0,099$ $p = \mathbf{0,005}$	$-0,382 \pm 0,096$ $p = \mathbf{0,002}$
b_3 %Plastificante	$0,259 \pm 0,120$ $p = \mathbf{0,050}$	$-0,353 \pm 0,099$ $p = \mathbf{0,003}$	$-0,987 \pm 0,096$ $p = \mathbf{0,000}$
b_4 Temperatura de mezclado T_{mix}	$0,705 \pm 0,120$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,704 \pm 0,099$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,209 \pm 0,096$ $p = \mathbf{0,047}$
b_{23} Velocidad×%Plastificante $v_{mix} \times \%Plastif.$	$-0,265 \pm 0,114$ $p = \mathbf{0,036}$	$-0,310 \pm 0,094$ $p = \mathbf{0,006}$	$-0,196 \pm 0,090$ $p = \mathbf{0,048}$

^a Coeficiente de regresión normalizado \pm error estándar, incluido el valor de *p*.

A partir del gráfico de coeficientes (ver figura 4.19) se puede observar el importante efecto de la temperatura de mezclado T_{mix} , la cual a mayores valores incrementa las tres respuestas evaluadas lo que puede apreciarse también en el figura 4.20a, 4.20b y 4.20c. La velocidad de mezcla v_{mix} muestra que debe ser manejada a valores bajos lo que incrementa las tres respuestas, y se debe tener en consideración que trabajando a valores altos de v_{mix} se produce una interacción con el %Plastif, el cual debiera ser utilizado a bajas proporciones para aumentar las propiedades mecánicas y térmicas (ver figura 4.20d, 4.20e y 4.20f).

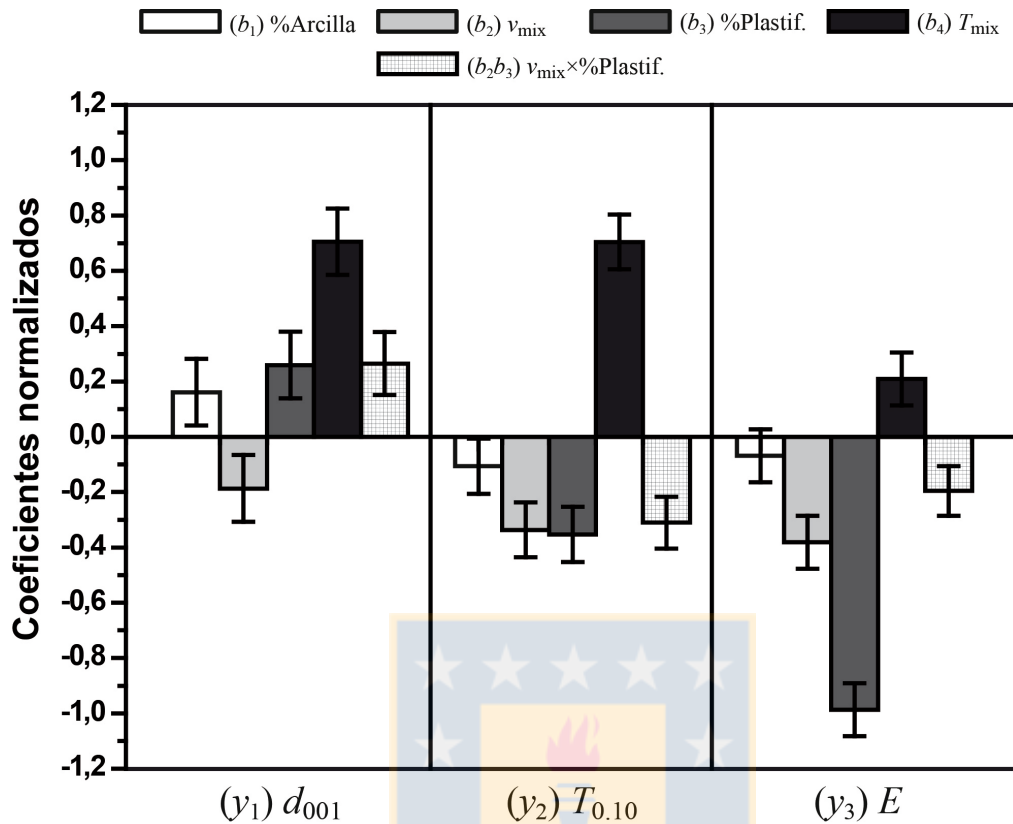


Figura 4.19. Gráfico de los coeficientes normalizados de regresión (b) obtenidos tras 3 PLS-componentes para cada respuesta en el modelo para la optimización de síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.

El %Plastif. se debe disminuir para lograr propiedades mecánicas mejores (mayores valores de E), esto debido a que mayores T_{mix} hay mayor pérdida de agua lo que conlleva a un material con mayor proporción de almidón y por tanto más cohesionado. Pero esto debe estar en equilibrio con que v_{mix} se utiliza para lograr formulaciones con mayores $T_{0.10}$ y mejores intercalaciones d_{001} .

Los gráficos de *loadings* (ver figura 4.21) confirma que variando el %Arcilla en la formulación en los niveles en que se evaluaron no se producen cambios significativos en las respuestas, puesto que la intersección de esta variable con la línea de cada respuesta está cercana al origen del gráfico de *loadings*. También en este gráfico de *loadings* se observa la importancia de trabajar a altas temperaturas para obtener respuestas más altas en temperaturas de descomposición e intercalaciones ya que la intersección de su proyección en las líneas de esta variable está muy alejada del origen (ver figura 4.21a y 4.21b).

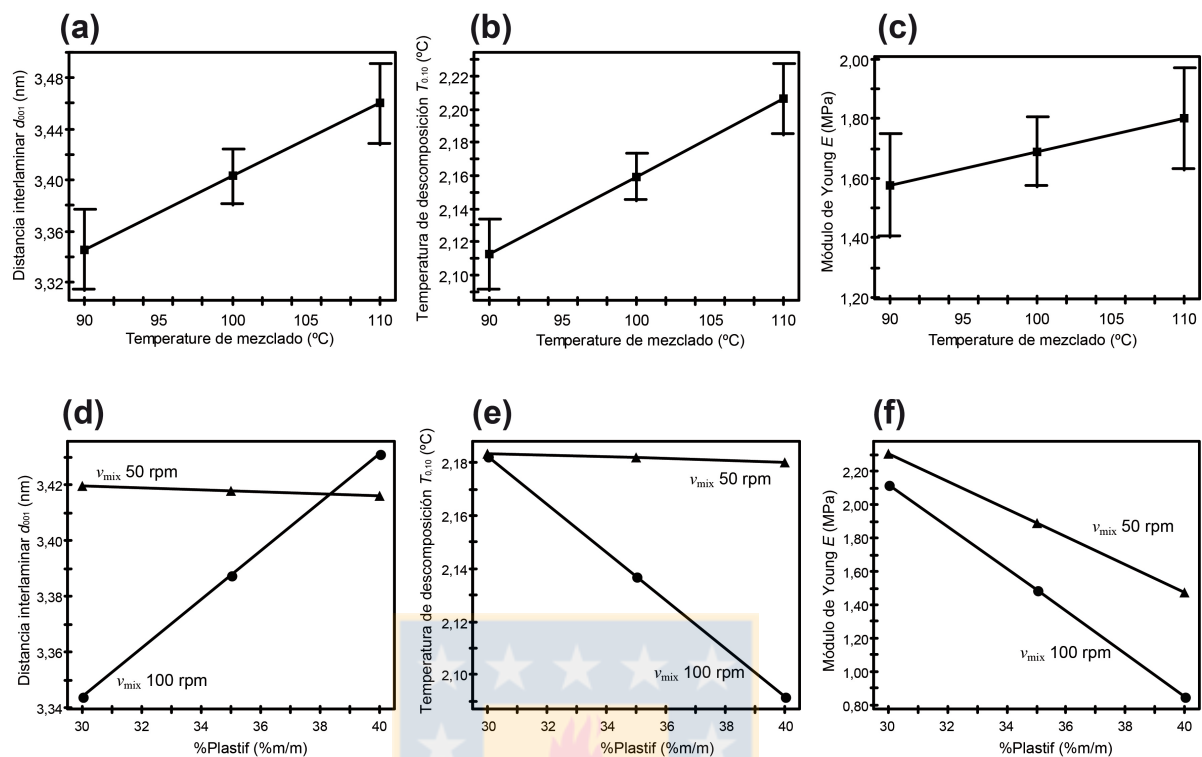


Figura 4.20. Gráfico de efectos de la variable T_{mix} sobre la respuesta de (a) distancia interlaminar d_{001} , (b) temperatura de descomposición $T_{0,10}$, y (c) módulo de Young E medida en films de nanocompuestos de ATP/MOM sintetizados mediante mezclado en estado fundido, indicándose el intervalo de confianza del 95 % en cada gráfico. Gráfico de interacciones entre v_{mix} y %Plastif. para las respuestas (d) distancia interlaminar d_{001} , (e) temperatura de descomposición $T_{0,10}$, y (f) módulo de Young E medida en films de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión.

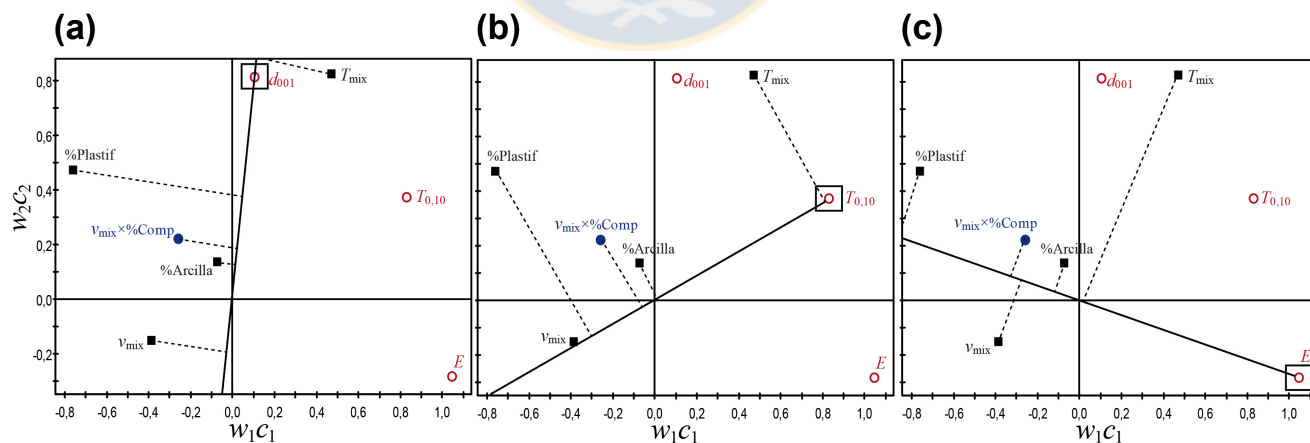


Figura 4.21. Gráfico de loadings w_1c_1 vs. w_2c_2 del modelo PLSR para las respuestas (a) distancia interlaminar d_{001} , (b) temperatura de descomposición $T_{0,10}$, y (c) módulo de Young E medidas en films de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión. (■) variables, (●) interacciones entre variables, (○) respuestas.

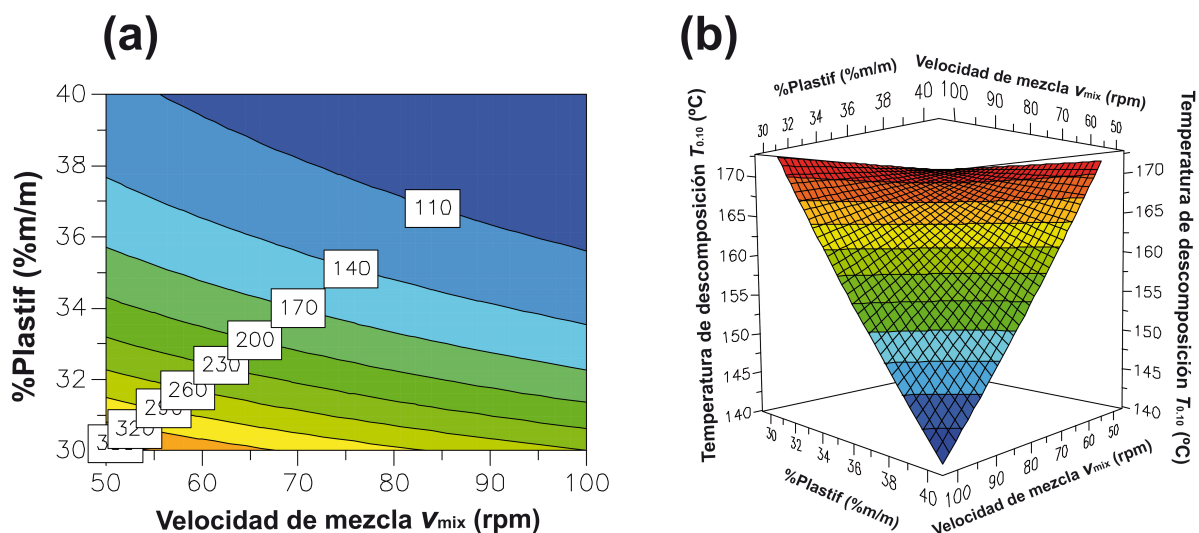


Figura 4.22. (a) Gráficos de contorno 2D %Plastif. vs. v_{mix} para la respuesta y_3 módulo de Young y (b) gráfico de superficie respuesta 3D %Plastif. vs. T_{mix} para la respuesta y_2 temperatura de descomposición $T_{0.10}$ obtenidos por modelo PLSR tras 3 PLS-componentes: (a) %Arcilla = 3 %m/m, $T_{mix} = 110$ °C, y (b) %Arcilla = 3 %m/m y $T_{mix} = 110$ °C.

El mapa superficie respuesta 3D para $T_{0.10}$ (ver figura 4.22b) muestra de manera gráfica la interacción $v_{mix} \times \%Plastif$ al mostrar una superficie “torcida” en la respuesta. Para el mapa de contorno 2D de la respuesta módulo de Young (ver figura 4.22a), la zona roja indica los mayores valores de E . Al utilizar menor cantidad de %Plastif y menor v_{mix} , cuando se trabaja a alta T_{mix} .

Tras el análisis del primer diseño experimental de *screening* se puede concluir que a las concentraciones de nanoarcilla que se trabajó se producen bionanocompuestos intercalados pero los valores de distancia interlamilar no se ven significativamente modificados variando en este rango de concentración, por lo que se estudiarán rangos más altos de %Arcilla en la formulación para determinar si estas mejoran las propiedades y se logran exfoliaciones. La T_{mix} es el factor que más influye en las tres respuestas medidas, siendo el nivel alto el que proporciona maximizaciones en las respuestas experimentales. La v_{mix} también se establece claramente que trabajando a baja velocidad se maximizan las respuestas medidas. La interacción entre v_{mix} y %Plastif. debe estudiarse para definir cuales son las condiciones óptimas para la síntesis, estudiándose en un segundo experimento como influye la razón de ambos plastificantes (glicerina y agua).

4.1.4. Optimización de las propiedades de empaque de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión: segundo diseño de experimentos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer diseño de experimentos, se procedió a realizar un segundo diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles (2^x) con cuatro variables: x_1 la concentración de nanoarcilla en la formulación (%Arcilla), x_2 la concentración del plastificante (%Plastif.), x_3 la proporción de plastificante en la formulación (%Plastif.), y x_4 la temperatura de mezclado (T_{mix}), con los niveles que se detallan en la tabla 4.13. La %Arcilla se varió esta vez en un rango más amplio – de 5 a 10 %m/m – para determinar si a mayores concentraciones hay cambios significativos en las respuestas. Por otro lado se modificó la composición del plastificante y se estudió como varían las respuestas al variar la concentración de éste en la formulación total, y la razón de glicerina:agua. Al variar esta razón del plastificante se debe optimizar también la temperatura de mezclado por lo que también se incluyó en el estudio.

Tabla 4.13. Segundo diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles describiendo las cuatro variables x para la síntesis de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.

	x_1 %Arcilla ^a (%m/m)	x_2 %Plastificante ^b (%m/m)	x_3 Glicerina/Agua ^c G/A	x_4 Temperatura de mezcla ^d T_{mix} (°C)
Puntos centrales (0) ^e	7,5	35,0	50:50	100
Puntos de esquina (-1/1)	5,0 / 10,0	30,0 / 40,0	25:75 / 75:25	90 / 110

^a Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

^b Concentración de plastificante (glicerina/agua) en la formulación.

^c Proporción de glicerina y agua como plastificante.

^d Temperatura de la tercera y cuarta zona de los tornillos. Primera zona: 70 °C; segunda zona: 90 °C.

^e Valores en paréntesis son los valores codificados de los niveles de las variables: (-1) = nivel menor de punto esquina, (0) = nivel central, (1) = nivel mayor de punto esquina.

El detalle de este segundo diseño experimental se muestra en la tabla 4.14 junto a los resultados experimentales de las tres respuestas medidas: como propiedad morfológica la distancia interlamina d_{001} , como propiedad térmica la temperatura de descomposición $T_{0,10}$, y como propiedad mecánica el módulo de Young E .

Tabla 4.14. Datos experimentales para segundo diseño experimental factorial completo (FFD) de 2 niveles (2^4) describiendo las cuatro variables x para la síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.

Exp ^a	Variables				Respuestas		
	x_1	x_2	x_3	x_4	y_1	y_2	y_3
	%Arcilla ^b (%m/m)	%Plastif. ^c (%m/m)	G/A ^d	T_{mix} ^e (°C)	d_{001} (nm)	$T_{0.10}$ (°C)	E (MPa)
1	5,0 (-1) ^f	30 (-1)	25 (-1)	90 (-1)	– ^g	–	110,00
2	10,0 (+1)	30 (-1)	25 (-1)	90 (-1)	16,159	142,63	161,00
3	5,0 (-1)	40 (+1)	25 (-1)	90 (-1)	16,712	138,33	43,23
4	10,0 (+1)	40 (+1)	25 (-1)	90 (-1)	16,100	174,62	65,13
5	5,0 (-1)	30 (-1)	75 (+1)	90 (-1)	17,651	172,68	126,00
6	10,0 (+1)	30 (-1)	75 (+1)	90 (-1)	17,866	158,58	115,50
7	5,0 (-1)	40 (+1)	75 (+1)	90 (-1)	17,510	157,95	35,23
8	10,0 (+1)	40 (+1)	75 (+1)	90 (-1)	18,161	147,56	43,17
9	5,0 (-1)	30 (-1)	25 (-1)	110 (+1)	–	–	–
10	10,0 (+1)	30 (-1)	25 (-1)	110 (+1)	–	–	–
11	5,0 (-1)	40 (+1)	25 (-1)	110 (+1)	16,523	277,61	–
12	10,0 (+1)	40 (+1)	25 (-1)	110 (+1)	17,440	268,34	318,00
13	5,0 (-1)	30 (-1)	75 (+1)	110 (+1)	15,925	196,37	47,57
14	10,0 (+1)	30 (-1)	75 (+1)	110 (+1)	17,939	188,67	99,20
15	5,0 (-1)	40 (+1)	75 (+1)	110 (+1)	–	185,10	46,17
16	10,0 (+1)	40 (+1)	75 (+1)	110 (+1)	17,722	160,71	53,90
17	7,5 (0)	35 (0)	50 (0)	100 (0)	16,775	–	85,85
18	7,5 (0)	35 (0)	50 (0)	100 (0)	16,840	149,82	74,95
19	7,5 (0)	35 (0)	50 (0)	100 (0)	16,970	165,66	85,15

^a Número de experimentos en el diseño.

^b Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

^c Concentración de plastificante en la formulación total.

^d Proporción de glicerina:agua como plastificante.

^e Temperatura de la tercera y cuarta zona de los tornillos. Primera zona: 70 °C; segunda zona: 90 °C.

^f Valores codificados para las variables.

^g Datos faltantes o excluidos.

Para relacionar las variables con las respuestas y encontrar la formulación más adecuada, se realizó la calibración mediante PLSR para obtener el polinomio que describe el comportamiento del sistema en estudio. La tabla 4.15 muestra que la calibración total de los datos experimentales tiene un $R^2 = 0,914$ lo que da confiabilidad y garantía para extraer información útil de él. Las respuestas individuales (ver figura 4.23) tienen ajustes por sobre $R^2 = 0,89$ y los valores de validez del modelo son superiores a 0,26 lo cual es satisfactorio tomando en cuenta que se calibran simultáneamente cuatro variables y tres respuestas.

Tabla 4.15. Evaluación del modelo de regresión PLSR (tras 4 componentes PLS) para síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.

Parámetro del modelo	Respuestas			Total
	d_{001}	$T_{0,10}$	E	
R^2	0,9370	0,8913	0,9161	0,9148
Q^2	0,6075	0,4511	0,2672	0,5250
Validez del modelo	0,3160	0,7735	0,2677	
Reproducibilidad	0,9806	0,8833	0,9829	
Número de condición				2,4207

El polinomio refinado que se ajusta a las respuestas estudiadas y que se postula está dado en la ecuación (7)

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 \quad (7)$$

Los coeficientes de regresión del polinomio propuesto junto a sus respectivos errores estándar y niveles de significancia se detallan en la tabla 4.16. El test ANOVA (ver tabla A.4, Anexo A) muestra además que el polinomio es significativamente ($p < 0,05$) predictivo y se ajusta a los datos experimentales. Los gráficos de *scores* u vs. t tienen correlación satisfactoria hasta el tercer PLS-componente con R^2 por sobre 0,83, lo que garantiza que la información extraída desde estos componentes es confiable.

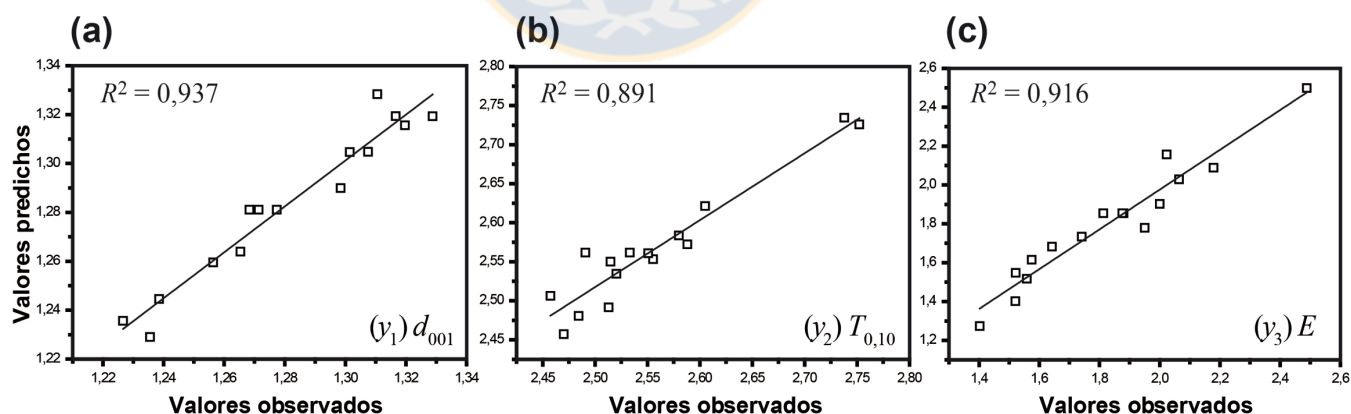


Figura 4.23. Gráfico de valores observados vs. valores predichos para cada respuesta modelada tras 4 PLS-componentes para la optimización de síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión. (a) y_1 distancia interlaminar d_{001} con transformación $\log(2y - 15)$ (b) y_2 temperatura de descomposición $T_{0,10}$ con transformación $\log(2y + 10)$ (c) y_3 módulo de Young E con transformación $\log(y - 10)$.

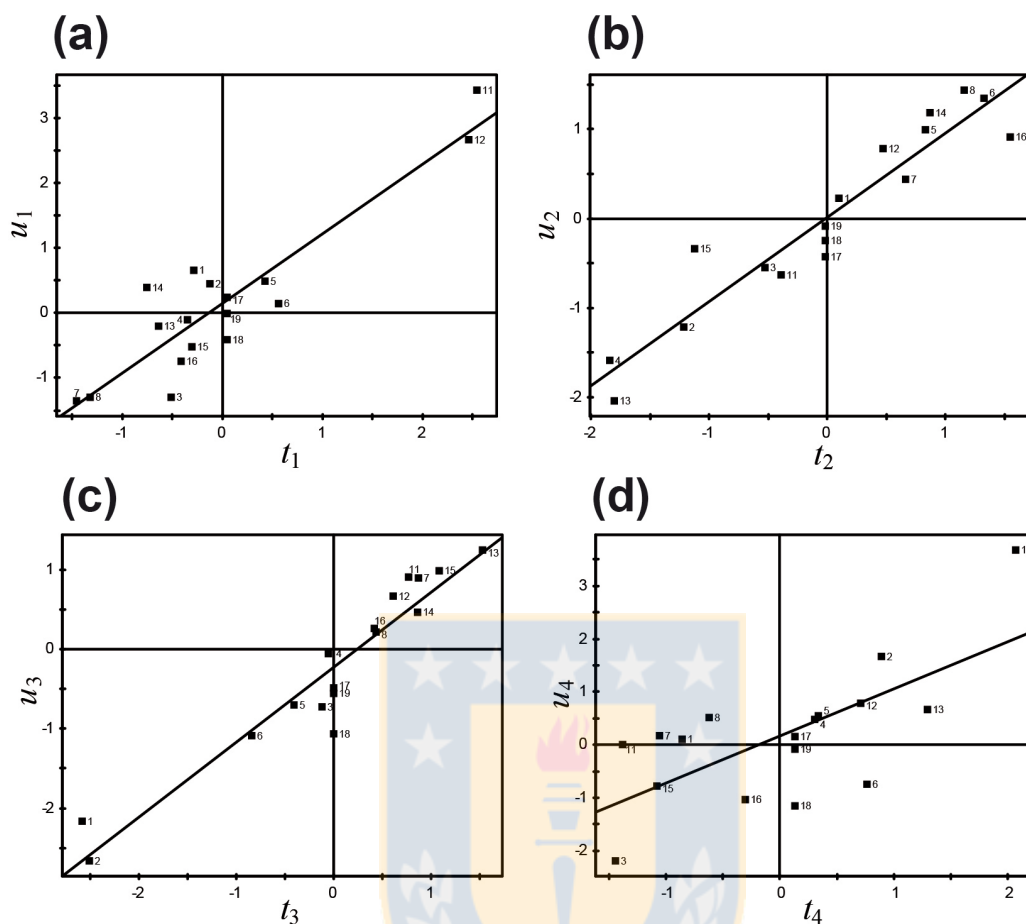


Figura 4.24. Gráficos de *scores* u vs. t obtenidos por PLSR para el segundo diseño experimental FFD en cada componente de PLS, (a) con primer componente $R^2 = 0,831$, (b) con segundo componente $R^2 = 0,900$, (c) con tercer componente $R^2 = 0,912$, (d) con cuarto componente $R^2 = 0,470$. Cada punto en el gráfico es un experimento del diseño.

De la tabla de coeficientes (ver tabla 4.16) y de la representación gráfica de ellos (ver figura 4.25) se puede apreciar que la inclusión del tipo de plastificante G/A (razón de glicerina:agua) impacta en la intercalación de la nanoarcilla ya que a mayor proporción de glicerina, el espacio interlamilar aumenta. Esto concuerda con reportes anteriores [118] que señalan que la glicerina aumenta *per se* las estructuras intercaladas en este tipo de bionanocompuestos por su alta afinidad por los iones sodio presentes en las galerías de la montmorillonita, produciendo su intercalación y aumentando d_{001} , lo que ayudaría a separar más las laminas de arcilla. Este comportamiento puede verse en el alto coeficiente de G/A en la respuesta d_{001} (ver figura 4.25) que indicaría que la proporción de plastificante con mayor cantidad de glicerina mejora la exfoliación. Pero para el módulo de Young el coeficiente G/A es grande y de signo contrario, y

G/A posee coeficientes de interacciones con T_{mix} y %Plastif. Esto puede deberse a que una concentración excesiva de glicerina aumentaría la interacción con el almidón, compitiendo con la interacción glicerina, almidón y nanoarcilla [120], por lo que tener la glicerina en una proporción justa, depende de que la T_{mix} sea alta para que elimine agua de la formulación produciendo un films más cohesivo y resistente.

Tabla 4.16. Coeficientes de regresión normalizados (b) calculados mediante PLSR (tras 4 componentes) para films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.

Término del polinomio	y_1 distancia interlamilar d_{001}	y_2 temperatura de descomposición $T_{0,10}$	y_3 módulo de Young E
constante b_0	$38,82 \pm 0,09^a$ $p = 0,000$	$29,18 \pm 0,124$ $p = 0,000$	$6,260 \pm 0,113$ $p = 0,000$
b_1 %Arcilla	$0,305 \pm 0,089$ $p = \mathbf{0,011}$	$-0,011 \pm 0,112$ $p = 0,924$	$0,275 \pm 0,106$ $p = \mathbf{0,036}$
b_2 %Plastif.	$-0,017 \pm 0,102$ $p = 0,870$	$0,093 \pm 0,134$ $p = 0,508$	$-0,463 \pm 0,122$ $p = \mathbf{0,007}$
b_3 G/A	$0,502 \pm 0,102$ $p = \mathbf{0,002}$	$-0,142 \pm 0,134$ $p = 0,324$	$-0,546 \pm 0,122$ $p = \mathbf{0,003}$
b_4 Temperatura de mezclado T_{mix}	$-0,090 \pm 0,102$ $p = 0,407$	$0,610 \pm 0,134$ $p = \mathbf{0,003}$	$0,298 \pm 0,122$ $p = \mathbf{0,044}$
b_{13} %Arcilla \times %G/A	$0,325 \pm 0,084$ $p = \mathbf{0,006}$	$-0,143 \pm 0,111$ $p = 0,237$	$-0,044 \pm 0,101$ $p = 0,675$
b_{14} %Arcilla \times T_{mix}	$0,428 \pm 0,084$ $p = \mathbf{0,001}$	$-0,094 \pm 0,111$ $p = 0,421$	$0,028 \pm 0,101$ $p = 0,791$
b_{23} %Plastif. \times G/A	$0,100 \pm 0,104$ $p = 0,368$	$-0,407 \pm 0,137$ $p = \mathbf{0,021}$	$-0,298 \pm 0,125$ $p = \mathbf{0,048}$
b_{24} %Plastif. \times T_{mix}	$0,084 \pm 0,104$ $p = 0,449$	$0,078 \pm 0,137$ $p = 0,587$	$0,489 \pm 0,125$ $p = \mathbf{0,006}$
b_{34} G/A \times T_{mix}	$-0,337 \pm 0,104$ $p = \mathbf{0,014}$	$-0,313 \pm 0,137$ $p = \mathbf{0,056}$	$-0,361 \pm 0,125$ $p = \mathbf{0,023}$

^a Coeficiente de regresión normalizado \pm error estándar, incluido el valor de p .

En las propiedades mecánicas de los bionanocompuestos se observa que el módulo de Young E incrementa su magnitud al aumentar el contenido de nanoarcilla. Esto se debe a que con los altos niveles de intercalación y exfoliación se forman estructuras laminares a lo largo de la matriz que aumentan la dureza y mayor rigidez y resistencia a la ruptura y el estiramiento. Sin embargo un aumento por sobre el límite puede ir en desmedro de las propiedades mecánicas, ya que se puede llegar a un punto en que las láminas de arcilla ya no pueden exfoliarse, y un

aumento de %Arcilla por sobre este límite lleva a la aparición de tactoides o agregados que deterioran las propiedades mecánicas [121].

Además observando el gráfico de coeficientes (ver figura 4.25), el importante coeficiente negativo de %Plastif. indica que al disminuir el contenido de plastificante en la formulación, produce en consecuencia un aumento del contenido de almidón en la formulación final lo que lleva a tener un material más cohesivo y por tanto con mayor resistencia mecánica. Por lo mismo, al tener una formulación con alto contenido de agua en el plastificante y una alta temperatura (por sobre 100 °C) permite que la plastificación vaya acompañada de la pérdida de agua por evaporación, lo que hace disminuir el %Plastif. y por tanto aumentar la proporción de almidón en la formulación final, por eso el coeficiente de G/A es grande y negativo para E , el coeficiente de T_{mix} es grande y positivo, y los coeficientes de interacción %Plastif $\times T_{mix}$ y el de G/A $\times T_{mix}$ son importantes.

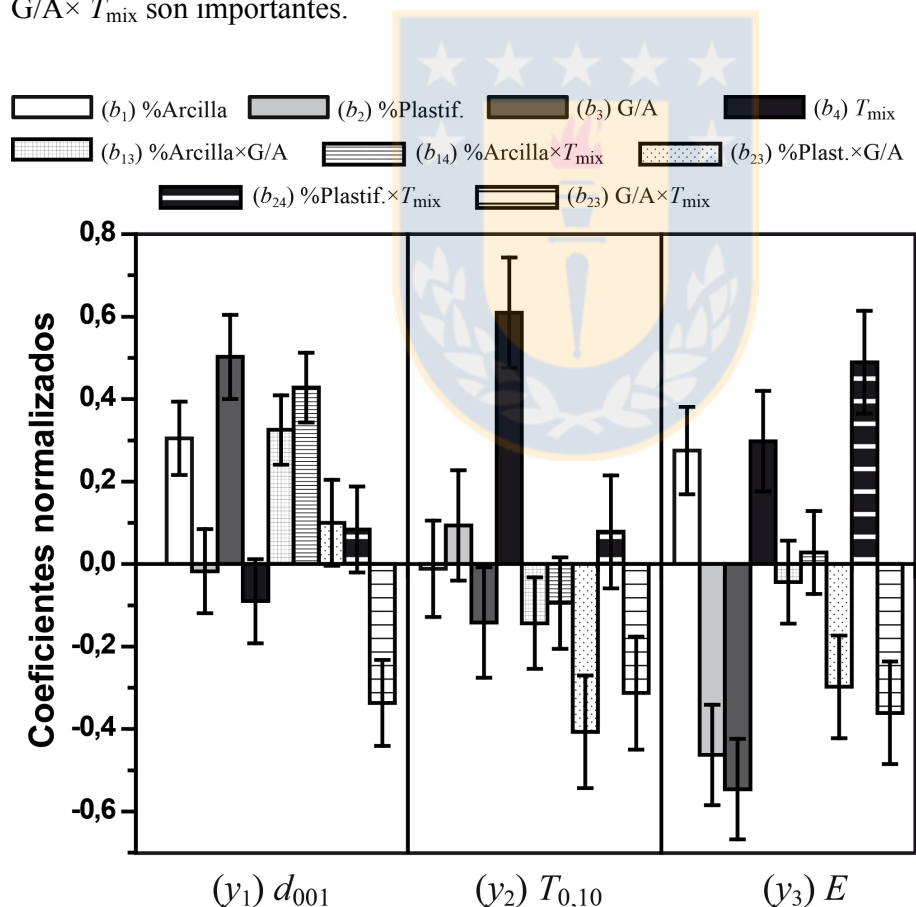


Figura 4.25. Gráfico normalizados de los coeficientes de regresión (b) obtenidos tras 4 PLS-componentes para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta y del segundo diseño experimental FFD para síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM por método de extrusión.

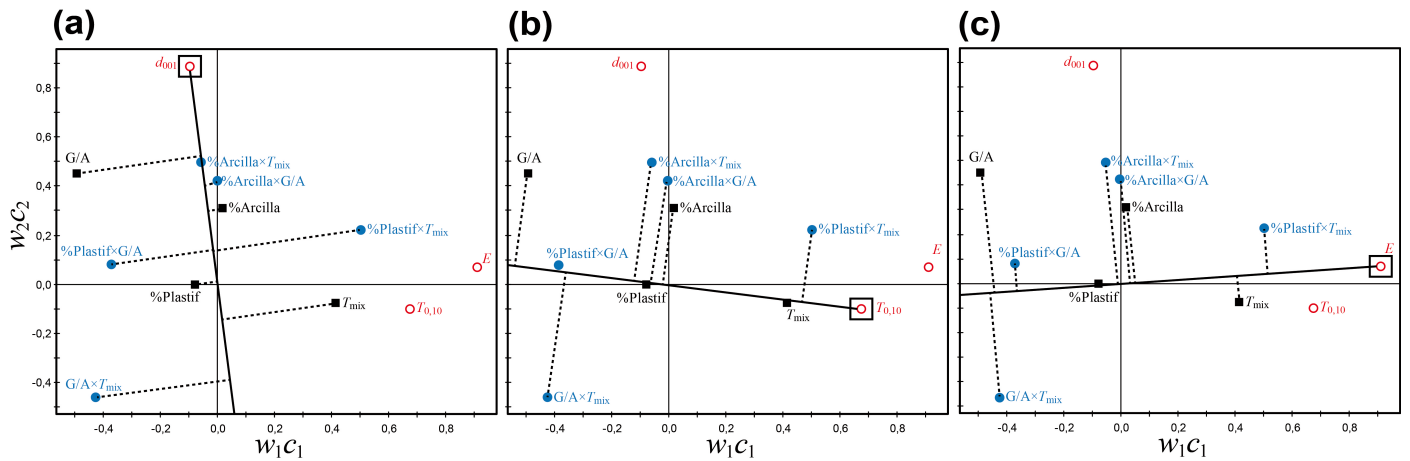


Figura 4.26. Gráfico de *loadings* w_1c_1 vs. w_2c_2 del modelo PLSR para segundo diseño de experimentos: (a) distancia interlaminar d_{001} , (b) temperatura de descomposición $T_{0,10}$, y (c) módulo de Young E medidas en films de bionanocompuestos de ATP/MOM sintetizados por método de extrusión. (■) variables, (●) interacciones entre variables, (○) respuestas.

Los gráficos de *loadings* (ver figura 4.26) muestran las importancias de las interacciones entre las variables que son significativas, esto hace que equilibrar la elección de la formulación óptima para las tres respuestas medidas sea una decisión compleja.

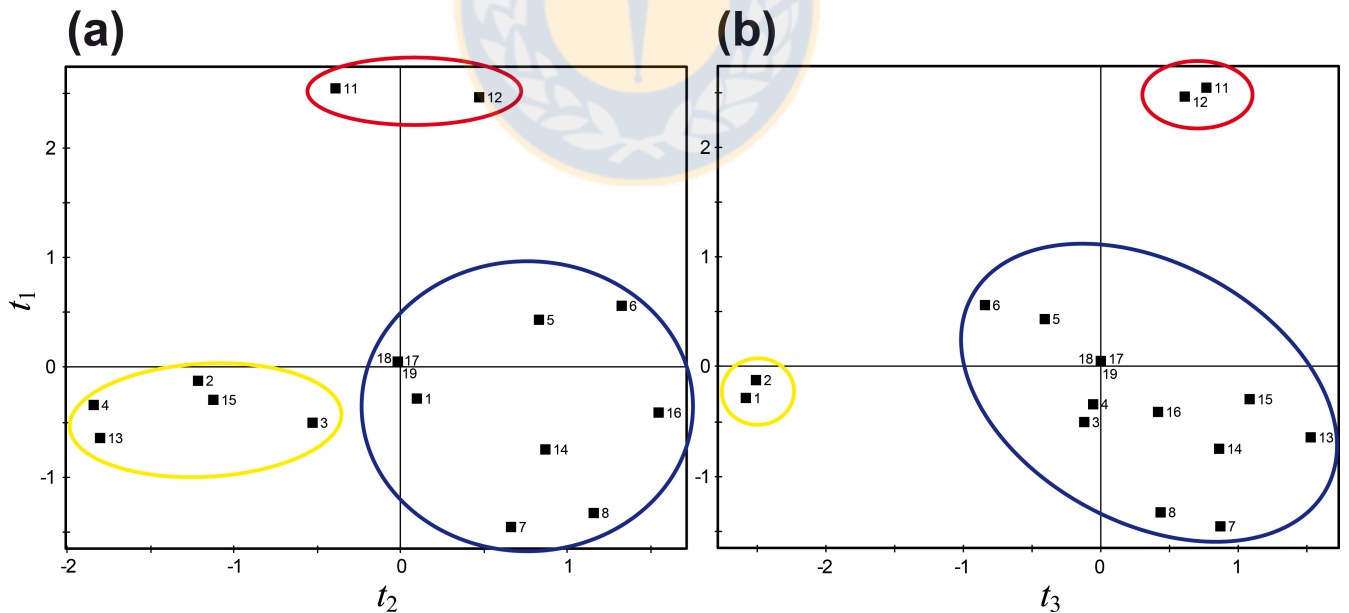


Figura 4.27. Gráficos de *x-scores* obtenidos por PLSR para el segundo diseño experimental FFD, (a) gráfico t_1 vs. t_2 , (b) gráfico t_1 vs. t_3 . Cada punto en el gráfico es un experimento del diseño.

Para solucionar problemáticas como éste, en donde hay un importante componente de interacciones entre variables, PLSR es una herramienta que también puede extraer información como si fuese un PCA. El gráfico de *x-scores* es una herramienta que puede mostrar las similitudes y diferencias entre los experimentos analizados, como se agrupan, que patrones presentan y cuales son las tendencias hacia las respuestas medidas, lo cual puede ser útil al momento de evaluar cual de los experimentos es el que en un contexto global – considerando todas las respuestas *y* – se acerca a las características buscadas. En la figura 4.27 se muestran los gráficos de *x-scores* para este segundo diseño de experimentos. La figura 4.27a muestra los *x-scores* del primer y segundo PLS-componente, en este gráfico se aprecian claramente tres *clusters* delimitados por las líneas coloreadas. Al analizar este gráfico se deduce que los *scores* del primer PLS-componente (t_1) divide principalmente los experimentos de acuerdo a las propiedades mecánicas (E) en donde esta respuesta aumenta de valor al subir a lo largo de este eje. Los *scores* del segundo componente (t_2) divide los experimentos principalmente de acuerdo a las propiedades morfológicas (d_{001}) en donde el valor de intercalación aumenta al subir hacia el lado positivo de este eje. En el gráfico 4.27b se puede concluir que los *scores* del tercer PLS-componente (t_3) – que también es significativo y muestra buena correlación ($R^2 = 0,912$) – divide los experimentos principalmente por las propiedades térmicas ($T_{0.10}$) en donde esta respuesta aumenta hacia el lado positivo de este eje. En el gráfico 4.27a las formulaciones delimitadas en amarillo poseen los valores de intercalación d_{001} y módulo de Young E más bajas. Las formulaciones delimitadas en azul poseen mejores propiedades mecánicas y térmicas, y dentro de este *cluster*, la maximización de estas respuestas se encuentra en los experimentos que están hacia el lado superior derecho (formulaciones N° 5 y N°6 del diseño experimental). Delimitados en rojo se encuentran las formulaciones que equilibran de mejor manera las tres respuestas medidas, siendo la formulación N° 11 la mejor ya que en el gráfico 4.27b se desplaza hacia la zona con mejor respuesta térmica. Estas formulaciones tienen en común la %Plastif. al 40 % y en una proporción glicerina/agua de 25:75 con síntesis a 110 °C lo que va de acuerdo a la interpretación que se hizo del gráfico de coeficientes y de *loadings* anteriormente. Finalmente, se considera como formulación óptima para las tres propiedades de empaque evaluadas, las variables en los niveles: %Arcilla = 5,0 %m/m Nanomer® montmorillonita sódica, %Plastif. = 40 %m/m, Glicerina/Agua = 25/75, $T_{\text{mix}} = 110$ °C, y $v_{\text{mix}} = 50$ rpm.

4.2. Estudio *in vitro* del efecto antifúngico de films de nanocompuestos sobre *Botrytis cinerea*

Para estudiar el efecto antifúngico de los principios activos derivados de aceites esenciales cargados en nano/bionanocompuestos se realizaron pruebas *in vitro* de inhibición de crecimiento de micelios de *Botrytis cinerea* – principal causante de enfermedad en frutillas – en PDA aplicando como modelo de prueba nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con carvacrol o timol. Para estos ensayos se utilizó la formulación y las condiciones de proceso optimizadas previamente en las secciones 4.1.1 y 4.1.2 para nanocompuestos de PEBD/MOM: %Arcilla = 3,1 %m/m Nanomer® I.44P, %Comp. = 4,0 %m/m, $T_{\text{mix}} = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mix}} = 7\text{ min}$, y $v_{\text{mix}} = 50\text{ rpm}$, Considerando la alta volatilidad del carvacrol y el timol, cuyas presiones de vapor son de 0,023 y 0,022 mm Hg a 25 °C respectivamente [122, 123], trabajar a la mínima temperatura de mezcla y con el mínimo tiempo de mezcla, reduciría al mínimo la pérdida de principio activo por volatilización durante el proceso de síntesis.

El efecto inhibitorio en el crecimiento de micelios de *Botrytis* se estudió por contacto directo de los films en el PDA y por efecto indirecto de los vapores de principio activo en el espacio cabeza, calculando la CI_{50} de cada principio activo cargados en los films. En la figura 4.28a y 4.28c se muestra el crecimiento de micelios de *Botrytis* al aplicar un nanocompuesto sin principio activo en su formulación, las cuales se expanden de manera radial sin inhibición alguna concluyéndose que ninguno de los constituyentes de la formulación (polímero, compatibilizante y nanoarcilla) a las concentraciones utilizadas posee efecto antifúngico contra este microorganismo.

Al cargar principio activo en los nanocompuestos se puede apreciar que cuando se aplican los nanocompuestos de manera indirecta sobre los micelios, se produce inhibición del crecimiento, esto debido al efecto de los vapores de carvacrol/timol que se desprenden del film y saturan el espacio cabeza de la cápsula (ver figura 4.28d). En el caso del efecto inhibitorio por contacto directo, se aprecia en la figura 4.28b que el crecimiento micelial se ve inhibido al llegar al lugar donde están depositados los films, y el crecimiento hacia el lado donde no hay nanocompuestos es mayor y éste solo puede verse afectado por la presencia de principio activo en la fase vapor.

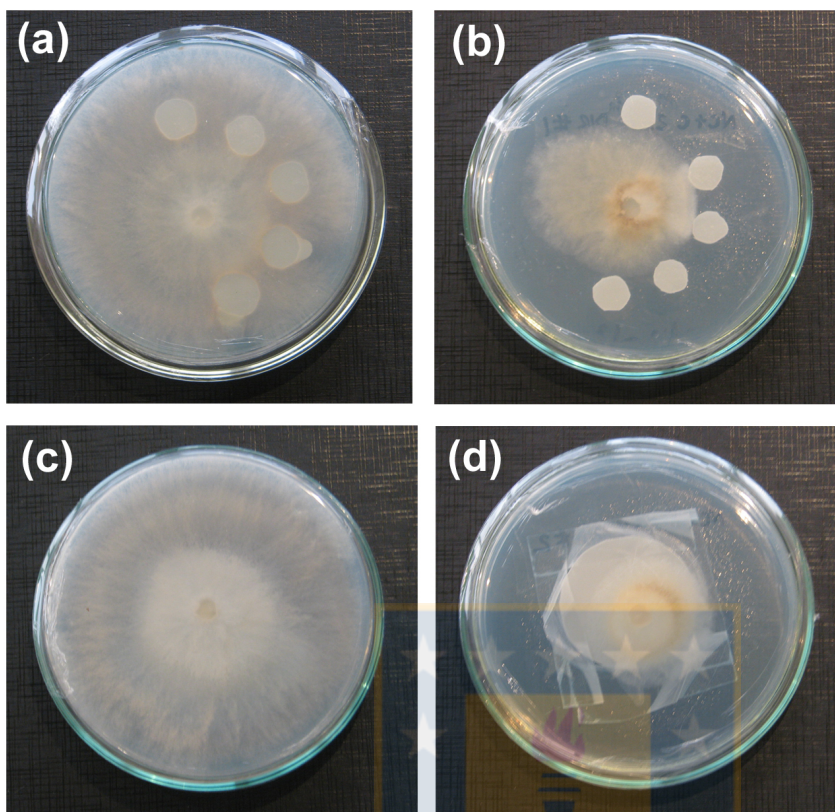


Figura 4.28. Selección de fotografías de ensayos en placas de PDA para pruebas *in vitro* del efecto antifúngico de films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con principios activos sobre micelios de *Botrytis cinerea* al 5º día de incubación. (a) nanocompuesto sin principio activo por contacto directo, (b) nanocompuesto con carvacrol 2,5 %m/m por contacto directo, (c) nanocompuesto sin principio activo por contacto indirecto, (d) nanocompuesto con carvacrol 2,5 %m/m por contacto indirecto.

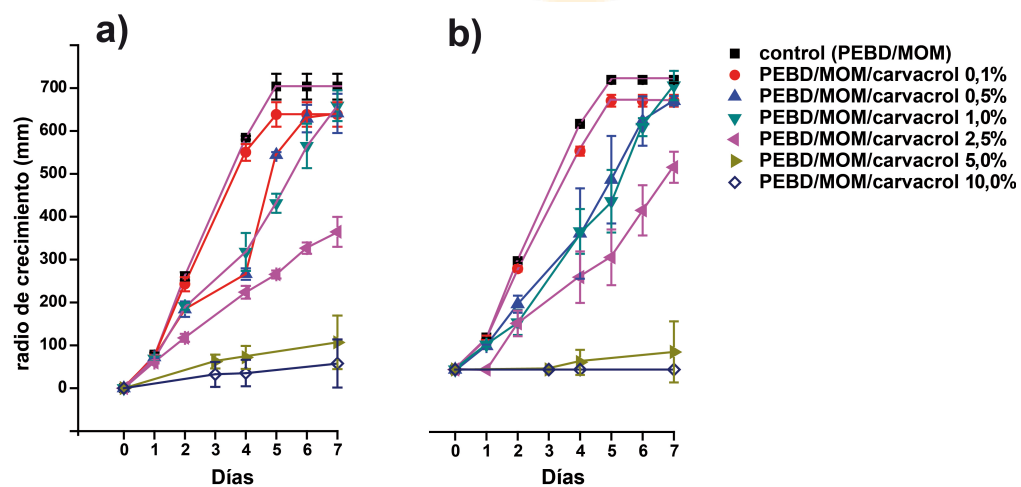


Figura 4.29. Ensayo *in vitro* de la inhibición del crecimiento de micelios de *Botrytis cinerea*: (a) contacto directo con nanocompuestos de PEBD/MOM/carvacrol ($n = 3$), (b) contacto indirecto por vapores de nanocompuestos de PEBD/MOM/carvacrol ($n = 3$).

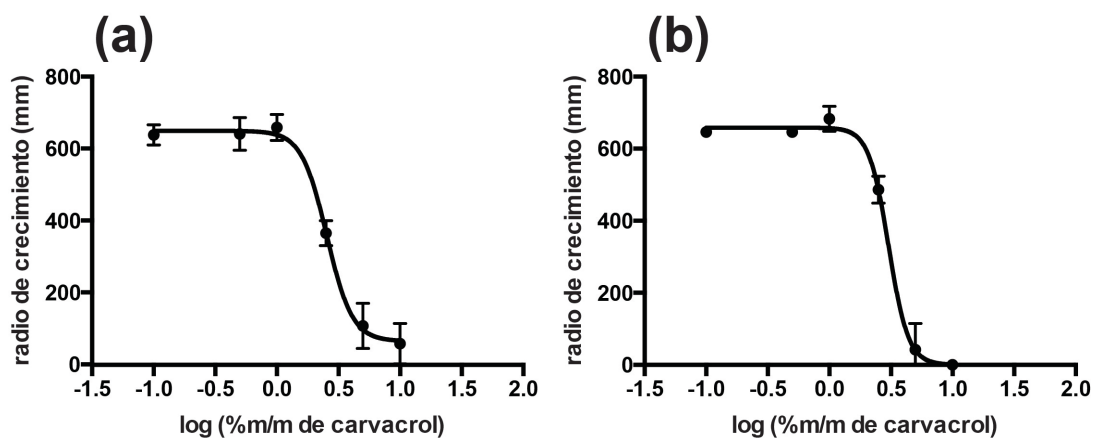


Figura 4.30. Curva de inhibición *in vitro* de films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con distintas concentraciones de carvacrol sobre micelios de *Botrytis cinerea* al séptimo día de incubación a 25 °C. (a) contacto directo de los films con el PDA, (b) contacto indirecto por medio de vapores de carvacrol.

En las figuras 4.29 y 4.31 se observa como se desarrolla el avance radial de los micelios en el agar con el paso de los días. Se deduce que tanto por contacto directo como indirecto hay una clara inhibición del crecimiento micelial usando tanto carvacrol como timol, y este crecimiento micelial se ve inhibido de manera proporcional con el aumento de la concentración de carga de principio activo en el film. En las figuras 4.30 y 4.32 se aprecia que esta inhibición sigue una curva sigmoideal con respecto a la concentración de principio activo en el film. Ajustando los datos experimentales (ver tabla A.5, Anexo A) a esta curva de inhibición se pudieron calcular los valores de CI_{50} para carvacrol y timol, tanto por contacto directo como indirecto, los cuales se muestran en la tabla 4.17.

Se observa en la tabla 4.17 que la inhibición mayor se obtiene por contacto directo de los films con el agar, esto puede deberse a que por un lado los principios activos difunden desde el film hacia el agar produciendo una zona concentrada de principio activo, y por otro lado hay un porcentaje de principio activo en fase vapor que también forma parte de la atmósfera en el espacio cabeza y que adicionalmente tiene efecto sobre los micelios. A pesar que se logran CI_{50} más bajas por contacto directo, los niveles de inhibición por contacto indirecto son también altos y efectivos, por lo que se considerarán ambas vías de acción para los posteriores estudios de control de liberación y estudios *in vivo* en frutillas.

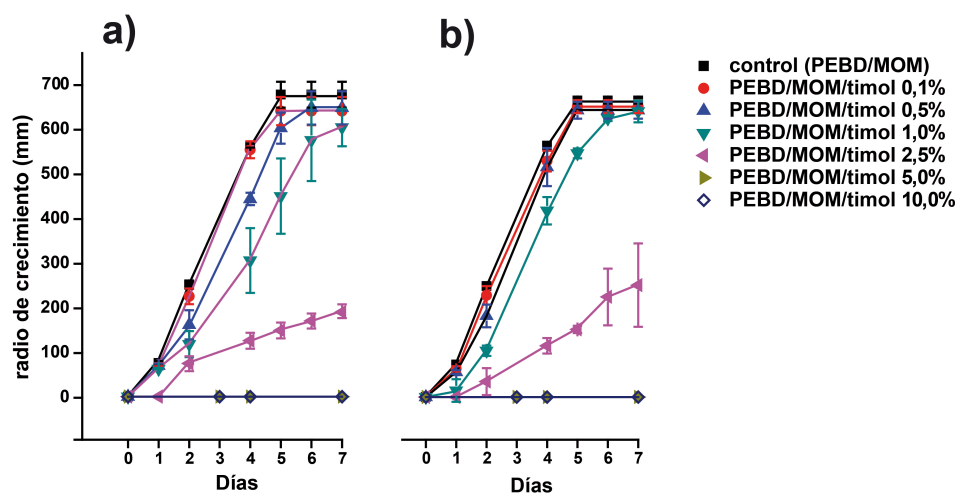


Figura 4.31. Ensayo *in vitro* de la inhibición del crecimiento de micelios de *Botrytis cinerea* mediante: (a) contacto directo con nanocompuestos de PEBD/MOM/timol ($n = 3$), (b) contacto por indirecto por vapores de nanocompuestos de PEBD/MOM/timol ($n = 3$).

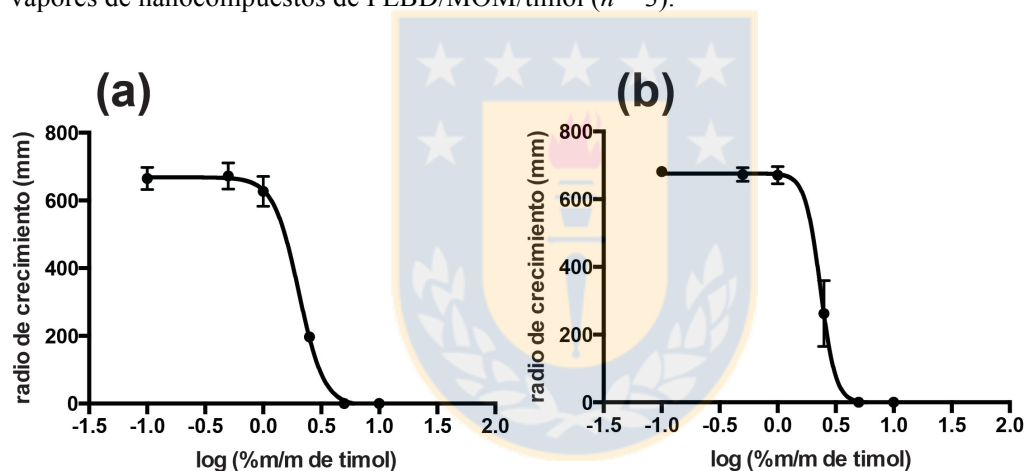


Figura 4.32. Curva de inhibición *in vitro* de films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con distintas concentraciones de timol sobre micelios de *Botrytis cinerea* al séptimo día de incubación a 25 °C. (a) contacto directo de los films con el PDA, (b) contacto indirecto por medio de vapores de timol.

Tabla 4.17. Determinación de CI_{50} *in vitro* de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con carvacrol/timol aplicados sobre micelios de *Botrytis cinerea* al cabo de 7 días de contacto a 25 °C.

	n (g.l.)	CI_{50} (%m/m)	Intervalo de confianza 95 % de CI_{50} (%m/m)	Ajuste sigmoidal R^2
PEBD/MOM/carvacrol				
Directo	18 (14)	$2,55 \pm 1,05^a$	2,29 a 2,83	0,9768
Indirecto	18 (14)	$3,03 \pm 1,05$	2,71 a 3,39	0,9869
PEBD/MOM/timol				
Directo	18 (14)	$2,03 \pm 1,04$	1,86 a 2,20	0,9940
Indirecto	18 (14)	$2,34 \pm 1,09$	1,96 a 2,79	0,9872

^a concentración de principio activo en la formulación de nanocompuesto \pm error estándar.

4.3. Estudio de la liberación de principios activos derivados de aceites esenciales desde nano/bionanocompuestos

Una vez definida la CI_{50} de carvacrol sobre el principal agente patógeno en frutillas, y con la optimización de las propiedades de empaque de los nano/bionanocompuestos – propiedades mecánicas, térmicas, reológicas y morfológicas – se procedió a estudiar el control de liberación de principios activos derivados de aceites esenciales, para posteriormente realizar las pruebas *in vivo* sobre los agentes patógenos objetivos en frutillas.

4.3.1. Migración de agentes antimicrobianos desde films poliméricos hacia alimentos

La migración de compuestos desde los materiales de empaque se da principalmente por difusión hacia la superficie del alimento o en el espacio cabeza del empaque si se trata de sustancias volátiles. La liberación de un compuesto desde una matriz polimérica consta de tres pasos: (1) la difusión dentro de la matriz polimérica hacia la interfase polímero/alimento, (2) transferencia de masa a través de la interfase, y (3) dispersión hacia el alimento o espacio cabeza. Generalmente la difusión es el paso que controla la velocidad debido a la alta resistencia de la matriz polimérica. La velocidad de migración de un compuesto en un empaque a base de matriz polimérica está influenciado por diferentes factores: método de fabricación del film polimérico; volatilidad y polaridad del compuesto migrante; interacciones químicas entre el agente migrante y las cadenas poliméricas; cambios en el polímero debido a la inclusión de agente migrante; polaridad del polímero; composición del alimentos; actividad de agua del alimento; pH del alimento; y condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad) [92].

La migración de moléculas activas desde materiales de empaque puede darse de tres maneras diferentes: (a) la no difusión, cuando las moléculas están inmovilizadas y fuertemente unidas a los sitios activos del material de empaque, (b) difusión bajo condiciones apropiadas, cuando las moléculas están parcialmente unidas y con menor fuerza al material, (c) difusión fácil, cuando las moléculas no están unidas al material [124]. La migración es principalmente un proceso de difusión, y para moléculas pequeñas en una capa polimérica se rige por la Ley de Fick (ecuación (8)):

$$q = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (8)$$

donde q es el flujo o cantidad que se transfiere por unidad de tiempo y área, C es la concentración de las moléculas que difunden, x es la coordenada que se mide en la dirección de la difusión, y D es el coeficiente de difusión efectiva. Desde el balance de masa y asumiendo que la difusión solo ocurre en la dirección x en un tiempo t dado, se deriva la segunda Ley de Fick (ecuación (9)):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (9)$$

A partir de dicha ley se pueden aproximar ecuaciones para la migración de masa de un compuesto desde un film polimérico en un simulador de alimento a corto y largo plazo. El tratamiento de datos puede hacerse tomando en cuenta por un lado la cinética total de liberación, y también por modelo de difusión [125]. Si se asume que la concentración de las moléculas que difunden sea inicialmente uniforme dentro del film, y la concentración en la superficie es cero, la solución a la ecuación (9) es

$$\frac{m_t}{m_\infty} = 1 - \left(\frac{8}{\pi^2}\right) \exp\left(\frac{-\pi^2 Dt}{l^2}\right) \quad (10)$$

donde m_t es la cantidad de migrante que abandona el film durante tiempo t , m_∞ es la cantidad de migrante que abandona el film una vez alcanzado el equilibrio, y l es el grosor del film para $m_t/m_\infty > 0.6$ (migración a largo plazo). La ecuación (10) se puede reordenar dando

$$\ln\left(1 - \frac{m_t}{m_\infty}\right) = \ln\left(\frac{8}{\pi^2}\right) - \left(\frac{\pi^2 Dt}{l^2}\right) \quad (11)$$

en donde al graficar $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs. t se obtiene una línea recta con intercepto en el eje y en $\ln(8/\pi^2)$ y cuya pendiente es la constante de velocidad de difusión $k_d = -(\pi^2 D/l^2)$.

Para valores de $m_t/m_\infty < 0.6$ (migración a corto plazo), la ecuación (11) se puede aproximar a

$$\frac{m_t}{m_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2}\right)^{1/2} \quad (12)$$

El gráfico m_t/m_∞ vs. $t^{1/2}$ da una línea recta que pasa por el origen y el coeficiente de difusión D se obtiene a partir de la pendiente $(16D/\pi l^2)^{1/2}$ en este gráfico.

El análisis de los resultados se pueden simplificar considerando el proceso de difusión total como un proceso único que obedece una cinética de primer orden, pudiéndose estimar la velocidad de liberación inicial v_0 según la ecuación (13)

$$v_0 = m_\infty k_1 \quad (13)$$

en donde k_1 es la constante de velocidad cinética total de primer orden que se puede obtener desde la pendiente del gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs. t para todo el set de datos. Para controlar o minimizar la liberación del agente migrante se deben obtener valores pequeños de v_0 y k_1 .

Estas ecuaciones son aproximaciones basadas en la asunción que la migración del compuesto en la matriz polimérica difunde desde una capa de film infinita de polímero inmersa en un volumen infinito de simulador de alimento, aunque estas aproximaciones se han encontrado que describen adecuadamente muchos sistemas reales y por tanto permiten una buena estimación de los parámetros cinéticos [125].

El estudio de las variables de formulación que influyen y modelan la cinética de liberación de los derivados de aceites esenciales por difusión hacia simulador de alimento y de pérdida por volatilización hacia el ambiente, se llevó a cabo tomando el carvacrol como droga modelo. Mediante diseño de experimento (DOE) se sintetizaron formulaciones de nano/bionanocompuestos con las condiciones de proceso optimizadas previamente, y en los cuales se cargó con carvacrol como principio activo modelo en las concentraciones CI_{50} obtenidas mediante los ensayos *in vitro* sobre *Botrytis cinerea* calculados previamente para cada material.

Se calcularon los parámetros de cinética y difusión velocidad de liberación inicial (v_0), constante de velocidad cinética total (k_1), coeficiente de difusión (D), y la constante de velocidad de difusión (k_d). Estos parámetros se calcularon previo gráfico de las cantidades de carvacrol liberadas a través del tiempo (de 1 a 60 días de muestreo) utilizando las ecuaciones previamente descritas.

4.3.2. Estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento.

Es difícil medir la migración de un agente antimicrobiano hacia alimentos ya que están compuestos por diferentes tipos de sustancias, tales como agua, lípidos, proteínas, hidratos de carbono, fibras, etc. Por esta razón los estudios se realizan hacia simuladores de alimentos, los cuales se clasifican de acuerdo a la naturaleza del alimento. Varios tipos de simuladores de alimentos son recomendados por la Comunidad Europea para los estudios de migración de sustancias desde envases. Para el caso de alimentos como las frutillas, que poseen un pH entre 3 y 4, se recomienda utilizar como simulador de alimento el tipo B para alimentos ácidos de pH < 4,5, el cual está compuesto por una solución acuosa al 3 % de ácido acético [99].

Para estudiar la cinética de liberación de carvacrol desde los films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia el simulador de alimento a 18 °C, se evaluaron tres variables en la formulación: (x_1) tipo de nanoarcilla, (x_2) concentración de nanoarcilla, y (x_3) concentración del compatibilizante. Los niveles para cada variable se detallan en la tabla 4.18. Los tipos de nanoarcillas que se detallan fueron los que en estudio preliminares obtuvieron los mejores resultados de intercalación.

Tabla 4.18. Variables a estudiar para el estudio de la cinética de liberación de carvacrol hacia simulador de alimento desde nanocompuestos de PEBD/MOM.

Variables cualitativas x	Nivel		
	A	B	C
x_1 Tipo de nanoarcilla (Nanomer [®]) ^a	I.30E	I.34TCN	I.44P
Variables cuantitativas x	Valores codificados		
	-1	0	+1
x_2 %Arcilla (%m/m)	3,0	4,0	5,0
x_3 %Comp. (%m/m)	4,0	5,5	7,0

^a A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

Las condiciones de proceso para la síntesis de los nanocompuestos se fijaron de acuerdo a la optimización hecha en la sección 4.1.2: 50 rpm de v_{mix} , 130 °C de T_{mix} , y 7 min de t_{mix} . La carga de carvacrol en la formulación fue la CI_{50} obtenida en el estudio *in vitro* sobre *Botrytis cinerea*: 2,55 %m/m de carvacrol en la formulación.

Al ser el tipo de nanoarcilla un parámetro de tipo cualitativo que posee niveles de tipo discreto, no existe un punto central en esta variable, por lo que crear un buen diseño de experimentos sin un excesivo número de experimentos es un desafío. Un diseño clásico para optimizar estos parámetros y detectar interacciones entre las variables – como el factorial completo de 3 niveles – constaría de 27 experimentos mas 3 puntos centrales, lo que es un exceso considerando la cantidad de muestreos a realizar por experimento. Una alternativa a estos diseños clásicos son los diseños generados por computadoras como el diseño D-optimal design. El diseño D-optimal es de gran utilidad cuando: (a) se evalúan variables cualitativas con más de dos niveles, (b) existen regiones experimentales irregulares, (c) crear un diseño experimental a partir de experimentos previos ya realizados, (d) cuando se evalúan sobre seis variables, y (e) cuando se quiere ajustar a un modelo de regresión especial [109]. Los diseños clásicos pueden ser generados a mano de manera fácil con cubos o cuadrados, pero en el caso de variables cualitativas de más de dos niveles y tratando de optimizar el número de experimentos se requieren algoritmos computacionales para generar el diseño óptimo. El diseño D-optimal tiene la ventaja de encontrar el número mínimo de experimentos que cubren de mejor manera el área experimental con el mejor balance, distribución y confiabilidad [126, 127].

Teniendo las variables a estudiar junto a sus respectivos niveles, mediante algoritmos iterativos se obtuvo un set de candidatos a diseño, de los cuales se escogió el diseño definitivo que logró maximizar el área experimental a abarcar y a la vez minimizar el número de experimentos. De los cinco diseños candidatos generados computacionalmente para este estudio de liberación, el diseño escogido constó de 15 experimentos más 3 puntos centrales (triplicado) para los cálculos de varianza, lo que da un total de 18 experimentos para evaluar el impacto de las tres variables x en el control de liberación de carvacrol.

Tabla 4.19. Resultado estadístico del diseño experimental generado por D–optimal usado para evaluar las variables que influyen en la liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento.

Criterio estadístico de evaluación	Valor
Objetivo	<i>Screening</i>
Tipo de modelo	Interacción
G–efficiency	82,35 %
log (Determinante de $X'X$)	10,1476
log normalizado (Determinante de $X'X$)	–0,161336
Número de condición	2,44939

En la tabla 4.19 se puede apreciar los criterios estadísticos por los cuales se escogió el diseño D-optimal utilizado. Este diseño posee un número de condición de 2,45 lo cual refleja una esfericidad y simetría aceptable en el diseño, además posee un valor de G-efficiency de 82,3 % que es la comparación o la performance del diseño comparado con el área abarcada por un diseño equivalente de tipo factorial completo de 3 niveles. Este parámetro debe estar entre valores sobre el 60 – 70 % para ser considerado aceptable [109].

El diseño D-optimal detallado con los experimentos se muestra en la tabla 4.20. Las respuestas a medir en este estudio fueron de dos tipos: por un lado los parámetros de cinética y difusión de carvacrol: y_1 velocidad de liberación inicial (v_0), y_2 constante de velocidad cinética total (k_1), y_3 coeficiente de difusión (D), e y_4 constante de velocidad de difusión (k_d); y por otro las propiedades de material de empaque del nanocompuesto: y_5 temperatura de descomposición ($T_{0.10}$), y_6 módulo de Young (E), y_7 temperatura de fusión (T_m), e y_8 distancia interlaminar (d_{001}).

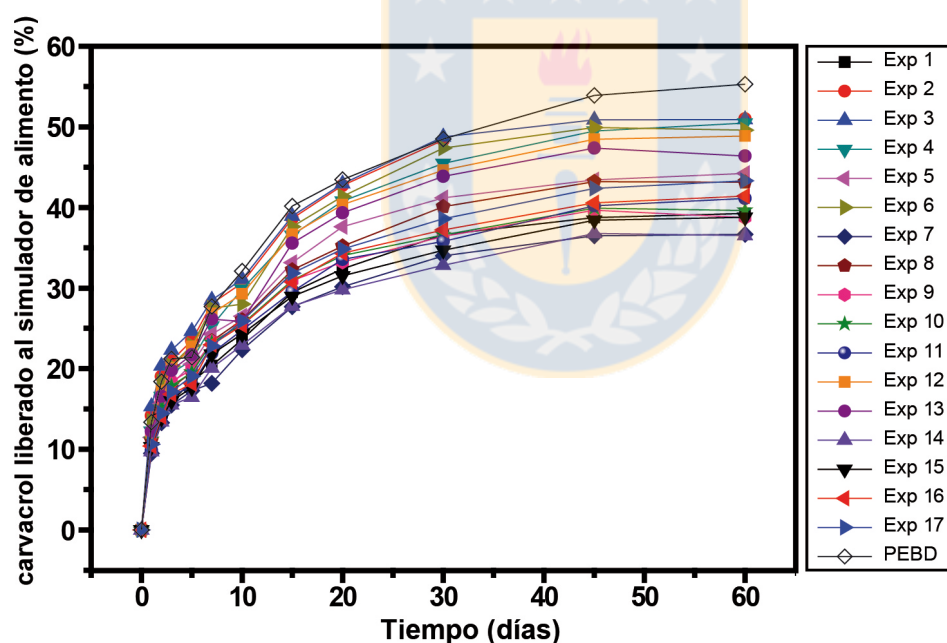


Figura 4.33. Curvas de liberación de carvacrol hacia el simulador de alimento desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a temperatura ambiente para todas las muestras del diseño experimental D-optimal comparadas con PEBD solo (\diamond). Experimento N° 18 excluido como *outlier*.

En la figura 4.33 se muestra el set completo de datos experimentales de liberación carvacrol hacia el simulador de alimento. Este gráfico de liberación muestra que hay un retardo en la liberación de carvacrol en los nanocompuestos comparada con el PEBD solo, disminuyendo la

cantidad total liberada y alterándose el perfil de esta liberación. Al ser constante los parámetros de espesor y área de film, temperatura, y concentración inicial de carvacrol, las desviaciones producidas en la liberación con respecto al polímero solo se deberían a la presencia de las diferentes nanoarcilla, su concentración y la concentración del compatibilizante.

El gráfico m_t/m_∞ vs. $t^{1/2}$ (ver figura 4.34a) muestra la liberación de carvacrol hasta aproximadamente el 60 % de la cantidad total liberada hasta el equilibrio, y el gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs. t (ver figura 4.34b) muestra la liberación de carvacrol por sobre el 60 % de la cantidad total liberada hasta el equilibrio. En estos gráficos se puede observar que la liberación a corto (< 60 %) y largo plazo (> 60 %) sigue una difusión tipo Fickiana ya que los datos se ajustan a una línea recta, y por tanto los parámetros de cinética de liberación pueden obtenerse confiablemente a partir de las ecuaciones de difusión y cinética expuestas anteriormente.

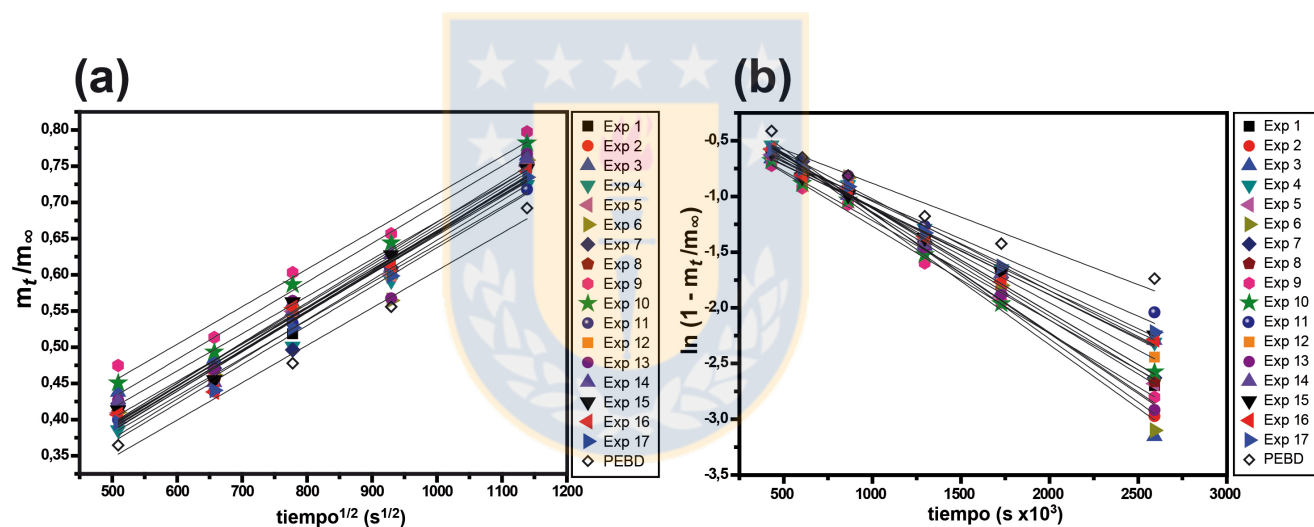


Figura 4.34. Gráfico de (a) m_t/m_∞ vs. $t^{1/2}$ y (b) $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs. t para la liberación de carvacrol hacia simulador de alimento a 18 °C desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM para todas las muestras del diseño experimental D-optimal comparado con PEBD solo (◇). Experimento N° 18 excluido como outlier.

Los parámetros de cinética y difusión obtenido de los datos experimentales se muestran en la tabla 4.20. Tras un análisis parcial y preliminar de estos datos, tomando tres formulaciones con diferentes tipos de nanoarcillas (a igual concentración de nanoarcilla y compatibilizante) se puede ya dimensionar el efecto de la nanoarcilla en la liberación de carvacrol. Esto se muestra en la tabla 4.21 en donde se comparan estos parámetros entre las diferentes nanoarcillas y el PEBD solo.

Tabla 4.20. Datos experimentales del diseño D–optimal para el estudio de la cinética de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia el simulador de alimento a 18 °C.

Exp. ^a	Variables			Respuestas							
	x_1 Tipo de arcilla ^b	x_2 %Arcilla (%/m/m)	x_3 %Comp. (%/m/m)	y_1 v_0 (g s ⁻¹)	y_2 k_1 (s ⁻¹)	y_3 D (m ² s ⁻¹)	y_4 k_d (s ⁻¹)	y_5 $T_{0,10}$ (°C)	y_6 E (MPa)	y_7 T_m (°C)	y_8 d_{001} (nm)
1	A	3,0 (-1) ^c	4,0 (-1)	1,016×10 ⁻¹⁰	8,548×10 ⁻⁰⁷	9,504×10 ⁻¹⁴	1,020×10 ⁻⁰⁶	436,1	314,3	112,9	34,932
2	A	3,0 (-1)	4,0 (-1)	1,039×10 ⁻¹⁰	8,757×10 ⁻⁰⁷	9,596×10 ⁻¹⁴	1,182×10 ⁻⁰⁶	442,1	306,3	112,7	37,817
3	A	5,0 (+1)	4,0 (-1)	1,426×10 ⁻¹⁰	8,666×10 ⁻⁰⁷	8,709×10 ⁻¹⁴	1,278×10 ⁻⁰⁶	409,4	366,5	112,1	34,146
4	A	3,0 (-1)	7,0 (+1)	8,506×10 ⁻¹¹	8,081×10 ⁻⁰⁷	8,868×10 ⁻¹⁴	8,133×10 ⁻⁰⁷	430,2	339,5	111,4	41,487
5	A	5,0 (+1)	7,0 (+1)	9,405×10 ⁻¹¹	9,147×10 ⁻⁰⁷	1,141×10 ⁻¹³	1,022×10 ⁻⁰⁶	432,8	392,7	112,8	40,612
6	B	3,0 (-1)	4,0 (-1)	9,328×10 ⁻¹¹	8,613×10 ⁻⁰⁷	1,033×10 ⁻¹³	9,547×10 ⁻⁰⁷	421,1	363,3	112,0	17,780
7	B	5,0 (+1)	4,0 (-1)	8,520×10 ⁻¹¹	8,338×10 ⁻⁰⁷	8,235×10 ⁻¹⁴	9,675×10 ⁻⁰⁷	425,2	376,0	– ^d	17,223
8	B	3,0 (-1)	7,0 (+1)	8,594×10 ⁻¹¹	8,305×10 ⁻⁰⁷	1,137×10 ⁻¹³	9,926×10 ⁻⁰⁷	414,1	364,0	112,3	17,549
9	B	5,0 (+1)	7,0 (+1)	8,465×10 ⁻¹¹	9,162×10 ⁻⁰⁷	1,255×10 ⁻¹³	9,522×10 ⁻⁰⁷	–	383,5	–	–
10	B	5,0 (+1)	7,0 (+1)	7,365×10 ⁻¹¹	9,379×10 ⁻⁰⁷	1,235×10 ⁻¹³	8,883×10 ⁻⁰⁷	440,3	382,0	112,4	17,475
11	C	3,0 (-1)	4,0 (-1)	6,865×10 ⁻¹¹	8,533×10 ⁻⁰⁷	1,155×10 ⁻¹³	9,341×10 ⁻⁰⁷	446,8	382,0	113,0	35,233
12	C	5,0 (+1)	4,0 (-1)	8,264×10 ⁻¹¹	8,396×10 ⁻⁰⁷	8,208×10 ⁻¹⁴	8,707×10 ⁻⁰⁷	449,8	396,0	112,9	34,941
13	C	3,0 (-1)	7,0 (+1)	–	8,460×10 ⁻⁰⁷	1,201×10 ⁻¹³	–	447,1	344,7	113,9	35,370
14	C	3,0 (-1)	7,0 (+1)	5,061×10 ⁻¹¹	8,349×10 ⁻⁰⁷	1,144×10 ⁻¹³	7,340×10 ⁻⁰⁷	442,9	344,5	113,2	36,746
15	C	5,0 (+1)	7,0 (+1)	5,215×10 ⁻¹¹	–	1,108×10 ⁻¹³	7,187×10 ⁻⁰⁷	442,8	377,7	114,6	34,541
16	C	4,0 (0)	5,5 (0)	6,683×10 ⁻¹¹	8,584×10 ⁻⁰⁷	1,022×10 ⁻¹³	8,727×10 ⁻⁰⁷	445,8	369,5	113,9	37,377
17	C	4,0 (0)	5,5 (0)	6,356×10 ⁻¹¹	8,781×10 ⁻⁰⁷	1,068×10 ⁻¹³	7,434×10 ⁻⁰⁷	449,1	381,0	113,2	35,544
18	C	4,0 (0)	5,5 (0)	–	–	–	–	440,8	369,0	113,1	34,211

^a Experimentos en el diseño.

^b A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

^c Valores codificados para las variables.

^d Valores excluidos o perdidos.

Se puede apreciar que la velocidad inicial de liberación v_0 se reduce hasta en más del doble en presencia de arcillas con respecto al polímero solo. Lo mismo ocurre para el coeficiente de difusión D y la constante de velocidad de difusión k_d .

Tabla 4.21. Análisis de difusión y cinético para la liberación de carvacrol en simulador de alimento a 18 °C desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con 4 % de compatibilizante.

Tipo de nanoarcilla ^a	Análisis cinético		Análisis de difusión	
	$v_0 \times 10^{-11}$ (g s ⁻¹)	$k_1 \times 10^{-7}$ (s ⁻¹)	$D \times 10^{-14}$ (m ² s ⁻¹)	$k_d \times 10^{-7}$ (s ⁻¹)
Nanomer [®] I.30E	14,26	8,666 ($R^2 = 0,986$) ^b	8,709 ($R^2 = 0,970$) ^c	12,76 ($R^2 = 0,991$) ^d
Nanomer [®] I.34TCN	8,520	8,338 ($R^2 = 0,987$)	8,235 ($R^2 = 0,926$)	9,675 ($R^2 = 0,997$)
Nanomer [®] I.44P	8,264	8,396 ($R^2 = 0,992$)	8,208 ($R^2 = 0,988$)	8,707 ($R^2 = 0,995$)
PEBD sin nanoarcilla	21,86	9,184 ($R^2 = 0,999$)	17,12 ($R^2 = 0,911$)	19,90 ($R^2 = 0,988$)

^a Concentración de 5 % m/m en la formulación.

^b Coeficiente de determinación de la recta del gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs. t para todo el set de datos.

^c Coeficiente de determinación de la recta del gráfico m_t/m_∞ vs. $t^{1/2}$ para $m_t/m_\infty < 0,6$.

^d Coeficiente de determinación de la recta del gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs. t para $m_t/m_\infty > 0,6$.

El análisis de las variables que modelan la liberación es complejo ya que en las respuestas no solo influyen el tipo y cantidad de arcilla y compatibilizante, sino también se debe considerar si hay interacciones entre estas variables, las cuales resultan un desafío complejo de descifrar. Además, estos parámetros se deben correlacionar con las propiedades de empaque de los nanocompuestos, para establecer un equilibrio a la hora de definir la formulación que permita por un lado controlar la liberación de carvacrol y por otro lado no sacrificar estas propiedades de empaque del material.

Para evaluar de manera conjunta las interrelaciones entre las variables estudiadas y los dos tipos de respuestas medidas (propiedades de empaque y parámetros de liberación) se utilizó como análisis quimiométrico de datos al diseño de experimentos la calibración multivariada por PLSR, y luego para definir la formulación con el mejor equilibrio para ambos tipos de respuestas se utilizó RSM y método de optimización SIMPLEX.

La tabla 4.22 muestra la evaluación del modelo obtenido por calibración con PLSR a partir de los resultados experimentales, cuyo polinomio es el expresado en la ecuación (14)

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (14)$$

La tabla 4.22 muestra que después de 7 PLS-componentes, el modelo de regresión postulado posee un $R^2 = 0,923$ y $Q^2 = 0,453$, lo que se consideran valores muy buenos teniendo en cuenta que se están calibrando tres variables con ocho respuestas diferentes de manera simultánea ($p < 0,05$), y además presenta los valores R^2 individuales para cada respuesta que van del rango de R^2 de 0,855 a 0,989, y un rango de Q^2 de 0,371 a 0,886 lo que nos da un fuerte indicio de que el modelo se ajusta bien y es confiable para extraer conclusiones de los resultados.

Tabla 4.22. Evaluación del modelo obtenido por PLSR (tras 7 PLS-componentes) del diseño experimental D-optimal utilizado para estudiar la liberación de carvacrol hacia simulador de alimento desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.

Parámetro del modelo	Respuestas								Total
	v_0	k_1	D	k_d	$T_{0,10}$	E	T_m	d_{001}	
R^2	0,9308	0,9110	0,9887	0,8999	0,8754	0,9568	0,8546	0,9571	0,9228
Q^2	0,5171	0,5689	0,8855	0,4212	0,4042	0,7528	0,3707	0,3989	0,4530
Validez del modelo	0,4238	0,5750	0,8792	0,9210	0,3679	0,3341	0,6198	0,3450	
Reproducibilidad	0,9458	0,8565	0,9698	0,6575	0,8929	0,9602	0,7450	0,9649	
Número de condición									2,3308

La figura 4.35 muestra el modelo de regresión PLS para cada respuesta al graficar los valores predichos por el modelo vs. los valores experimentales obtenidos. Se puede observar que todas las respuestas tienen un ajuste de modelo $R^2 > 0,85$. La tabla A.6 (ver Anexo A) muestra la significancia estadística del modelo para cada respuesta y utilizando un test ANOVA.

Los gráficos de *scores u* vs. *t* para los primeros cuatro PLS-componente (ver figura 4.36) muestran una muy buena correlación y homogeneidad en los datos experimentales, estando las variables y las respuestas de los experimentos correlacionadas con $R^2 > 0,82$ para estos cuatro primeros PLS-componentes, desde los cuales se puede extraer información confiable para el análisis de datos.

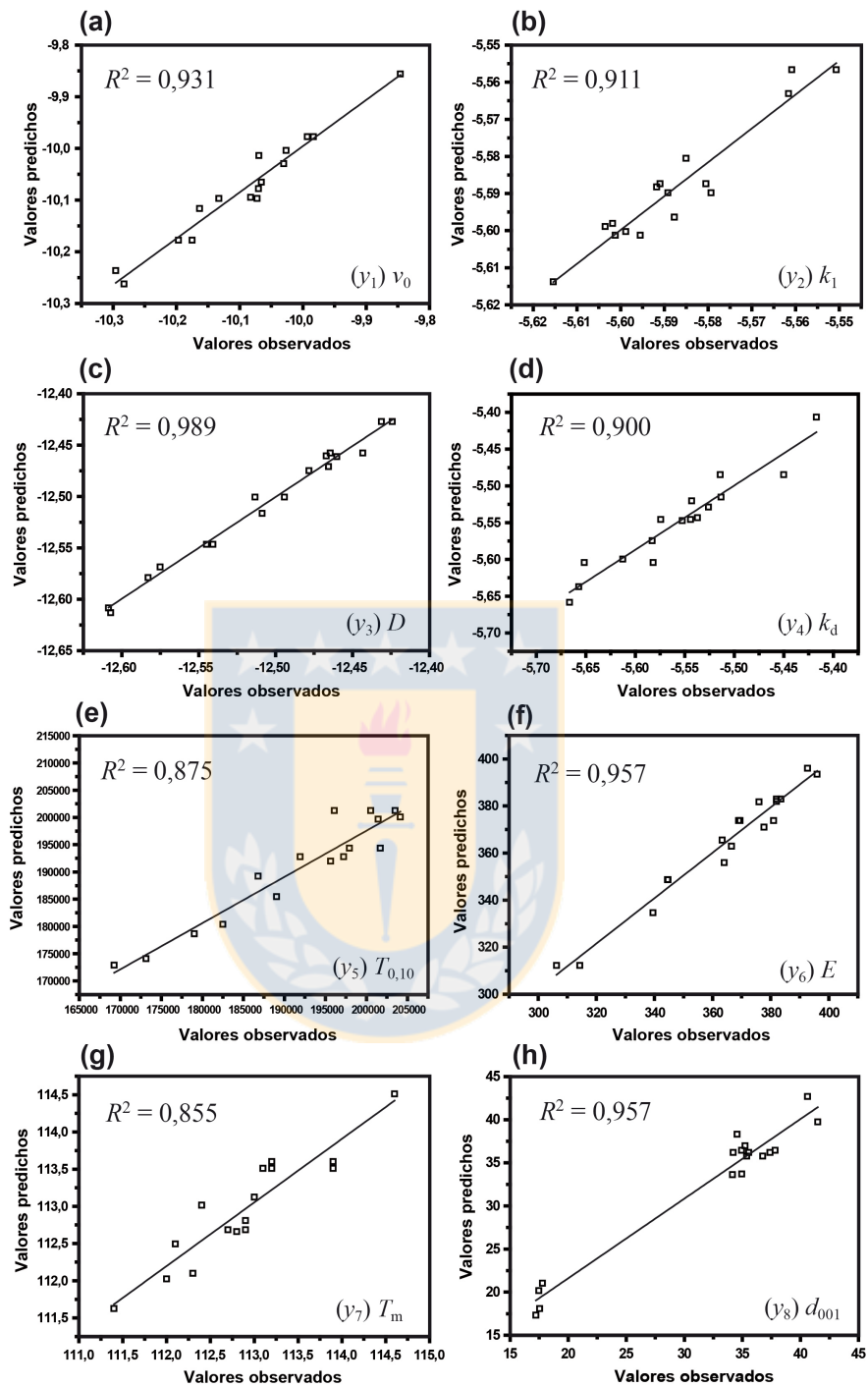


Figura 4.35. Gráfico de valores observados vs. valores predichos para cada respuesta modelada tras 7 PLS-componentes para el estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento a 18 °C. (a) y_1 velocidad de liberación inicial v_0 con transformación $\log(y)$, (b) y_2 constante de velocidad cinética total k_1 con transformación $\log(3y)$, (c) y_3 coeficiente de difusión D con transformación $\log(3y)$, (d) y_4 constante de velocidad de difusión k_d con transformación $\log(3y)$, (e) y_5 temperatura de descomposición $T_{0,10}$ con transformación $(y + 2)^2$, (f) y_6 módulo de Young E , (g) y_7 temperatura de fusión T_m , y (h) y_8 distancia interlamilar d_{001} .

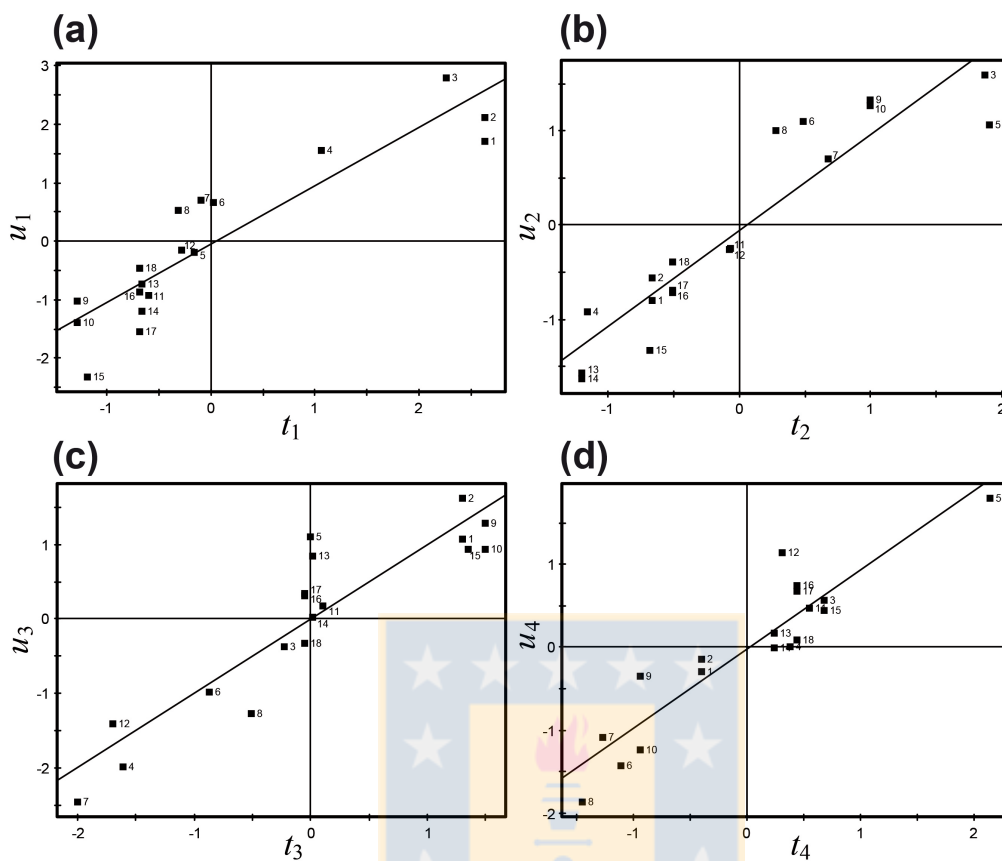


Figura 4.36. Gráficos de *scores* u vs. t obtenidos por PLSR para el diseño experimental D-optimal para el estudio de la cinética de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM en simulador de alimento para los primeros cuatro PLS-componente, (a) primer componente $R^2 = 0,822$, (b) segundo componente $R^2 = 0,859$, (c) tercer componente $R^2 = 0,835$, (d) cuarto componente $R^2 = 0,855$. Cada punto en el gráfico corresponde a un experimento del diseño.

Los coeficientes de regresión del modelo se exponen en la tabla 4.23, y su representación gráfica se muestra en la figura 4.37. A partir de estos coeficientes se observa que la nanoarcilla I.44P con dimetil dialquil (C14–C18) amina como modificador (Arcilla A) tiene el mayor impacto en todas las respuestas de propiedades de empaque ($T_{0.10}$, E , T_m y d_{001}) siendo un impacto positivo en estas respuestas debido a que aumenta los valores de éstas ya que su coeficiente es positivo y de gran magnitud. Esto está en concordancia con estudios preliminares que mostraban que utilizando esta nanoarcilla se obtenían las intercalación más altas de acuerdo a análisis por DRX y microscopía, y la evidencia muestra que al aumentar los niveles de intercalación se aumenta la resistencia mecánica del material y las propiedades térmicas como la temperatura de descomposición y la temperatura de fusión aumentan [128].

Tabla 4.23. Coeficientes de regresión normalizados (*b*) calculados mediante PLSR (tras 7 PLS-componentes) para el estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento.

Término del polinomio	y_1 velocidad de liberación inicial v_0	y_2 constante de velocidad cinética total k_1	y_3 coeficiente de difusión D	y_4 constante de velocidad de difusión k_d	y_5 temperatura de descomposición $T_{0,10}$	y_6 módulo de Young E	y_7 temperatura de fusión T_m	y_8 distancia interlaminar d_{001}
constante b_0	$-88,53 \pm 0,09^a$ $p = 0,000$	$-322,42 \pm 0,10$ $p = 0,000$	$-207,21 \pm 0,04$ $p = 0,000$	$-80,19 \pm 0,10$ $p = 0,000$	$17,92 \pm 0,12$ $p = 0,000$	$14,58 \pm 0,07$ $p = 0,000$	$141,93 \pm 0,13$ $p = 0,000$	$3,767 \pm 0,070$ $p = 0,000$
b_1 Arcilla A ^b	$0,689 \pm 0,123$ $p = \mathbf{0,001}$	$0,057 \pm 0,139$ $p = 0,694$	$-0,385 \pm 0,047$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,549 \pm 0,148$ $p = \mathbf{0,006}$	$-0,390 \pm 0,158$ $p = \mathbf{0,038}$	$-0,440 \pm 0,090$ $p = \mathbf{0,001}$	$-0,430 \pm 0,178$ $p = \mathbf{0,042}$	$0,585 \pm 0,093$ $p = \mathbf{0,000}$
b_1 Arcilla B ^b	$0,138 \pm 0,117$ $p = 0,271$	$0,031 \pm 0,133$ $p = 0,823$	$0,156 \pm 0,045$ $p = \mathbf{0,009}$	$0,158 \pm 0,141$ $p = 0,294$	$-0,540 \pm 0,150$ $p = \mathbf{0,007}$	$0,185 \pm 0,085$ $p = 0,061$	$-0,460 \pm 0,170$ $p = \mathbf{0,026}$	$-1,099 \pm 0,088$ $p = \mathbf{0,000}$
b_1 Arcilla C ^b	$-0,827 \pm 0,116$ $p = 0,333$	$-0,087 \pm 0,132$ $p = 0,526$	$0,229 \pm 0,045$ $p = \mathbf{0,001}$	$-0,707 \pm 0,140$ $p = \mathbf{0,001}$	$0,930 \pm 0,149$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,255 \pm 0,084$ $p = \mathbf{0,017}$	$0,890 \pm 0,168$ $p = \mathbf{0,001}$	$0,514 \pm 0,087$ $p = \mathbf{0,000}$
b_2 %Arcilla	$0,110 \pm 0,107$ $p = 0,333$	$0,526 \pm 0,121$ $p = \mathbf{0,002}$	$-0,259 \pm 0,041$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,045 \pm 0,128$ $p = 0,737$	$-0,009 \pm 0,137$ $p = 0,949$	$0,568 \pm 0,078$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,231 \pm 0,155$ $p = 0,174$	$-0,018 \pm 0,080$ $p = 0,828$
b_3 %Comp.	$-0,445 \pm 0,107$ $p = \mathbf{0,003}$	$0,207 \pm 0,121$ $p = 0,126$	$0,554 \pm 0,041$ $p = \mathbf{0,000}$	$-0,484 \pm 0,128$ $p = \mathbf{0,005}$	$0,047 \pm 0,137$ $p = 0,739$	$-0,088 \pm 0,078$ $p = 0,290$	$0,335 \pm 0,155$ $p = 0,062$	$0,116 \pm 0,080$ $p = 0,185$
b_{12} Arcilla A×%Arcilla	$0,219 \pm 0,121$ $p = 0,108$	$0,201 \pm 0,138$ $p = 0,182$	$0,399 \pm 0,047$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,379 \pm 0,146$ $p = \mathbf{0,032}$	$-0,409 \pm 0,156$ $p = \mathbf{0,030}$	$0,365 \pm 0,088$ $p = \mathbf{0,003}$	$0,030 \pm 0,176$ $p = 0,870$	$0,019 \pm 0,091$ $p = 0,844$
b_{12} Arcilla B×%Arcilla	$-0,110 \pm 0,113$ $p = 0,361$	$-0,011 \pm 0,128$ $p = 0,932$	$-0,001 \pm 0,044$ $p = 0,976$	$-0,115 \pm 0,136$ $p = 0,423$	$0,364 \pm 0,145$ $p = \mathbf{0,037}$	$-0,112 \pm 0,082$ $p = 0,211$	$-0,033 \pm 0,164$ $p = 0,847$	$0,018 \pm 0,085$ $p = 0,837$
b_{12} Arcilla C×%Arcilla	$-0,109 \pm 0,126$ $p = 0,411$	$-0,189 \pm 0,143$ $p = 0,222$	$-0,398 \pm 0,049$ $p = \mathbf{0,000}$	$-0,264 \pm 0,152$ $p = 0,120$	$0,045 \pm 0,162$ $p = 0,788$	$-0,253 \pm 0,092$ $p = \mathbf{0,025}$	$0,003 \pm 0,183$ $p = 0,987$	$-0,037 \pm 0,095$ $p = 0,710$
b_{13} Arcilla A×%Comp.	$-0,046 \pm 0,120$ $p = 0,713$	$-0,266 \pm 0,136$ $p = 0,087$	$-0,195 \pm 0,046$ $p = \mathbf{0,003}$	$-0,217 \pm 0,145$ $p = 0,172$	$0,130 \pm 0,154$ $p = 0,425$	$0,446 \pm 0,088$ $p = \mathbf{0,001}$	$-0,450 \pm 0,174$ $p = \mathbf{0,033}$	$0,157 \pm 0,091$ $p = 0,121$
b_{13} Arcilla B×%Comp.	$0,130 \pm 0,114$ $p = 0,287$	$0,238 \pm 0,129$ $p = 0,103$	$0,245 \pm 0,044$ $p = \mathbf{0,001}$	$0,303 \pm 0,137$ $p = \mathbf{0,058}$	$0,064 \pm 0,146$ $p = 0,674$	$-0,066 \pm 0,083$ $p = 0,451$	$0,105 \pm 0,165$ $p = 0,542$	$-0,107 \pm 0,086$ $p = 0,249$
b_{13} Arcilla C×%Comp.	$-0,084 \pm 0,126$ $p = 0,523$	$0,028 \pm 0,143$ $p = 0,852$	$-0,050 \pm 0,049$ $p = 0,333$	$-0,086 \pm 0,152$ $p = 0,587$	$-0,193 \pm 0,162$ $p = 0,267$	$-0,380 \pm 0,092$ $p = \mathbf{0,003}$	$0,345 \pm 0,183$ $p = 0,097$	$-0,050 \pm 0,095$ $p = 0,610$
b_{23} %Arcilla×%Comp.	$-0,100 \pm 0,099$ $p = 0,340$	$0,556 \pm 0,112$ $p = \mathbf{0,001}$	$0,475 \pm 0,038$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,010 \pm 0,110$ $p = 0,933$	$0,310 \pm 0,127$ $p = \mathbf{0,040}$	$-0,073 \pm 0,072$ $p = 0,336$	$0,326 \pm 0,143$ $p = \mathbf{0,052}$	$0,141 \pm 0,074$ $p = 0,095$

^a Coeficiente de regresión normalizado \pm error estándar, incluido el valor de *p*.

^b A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

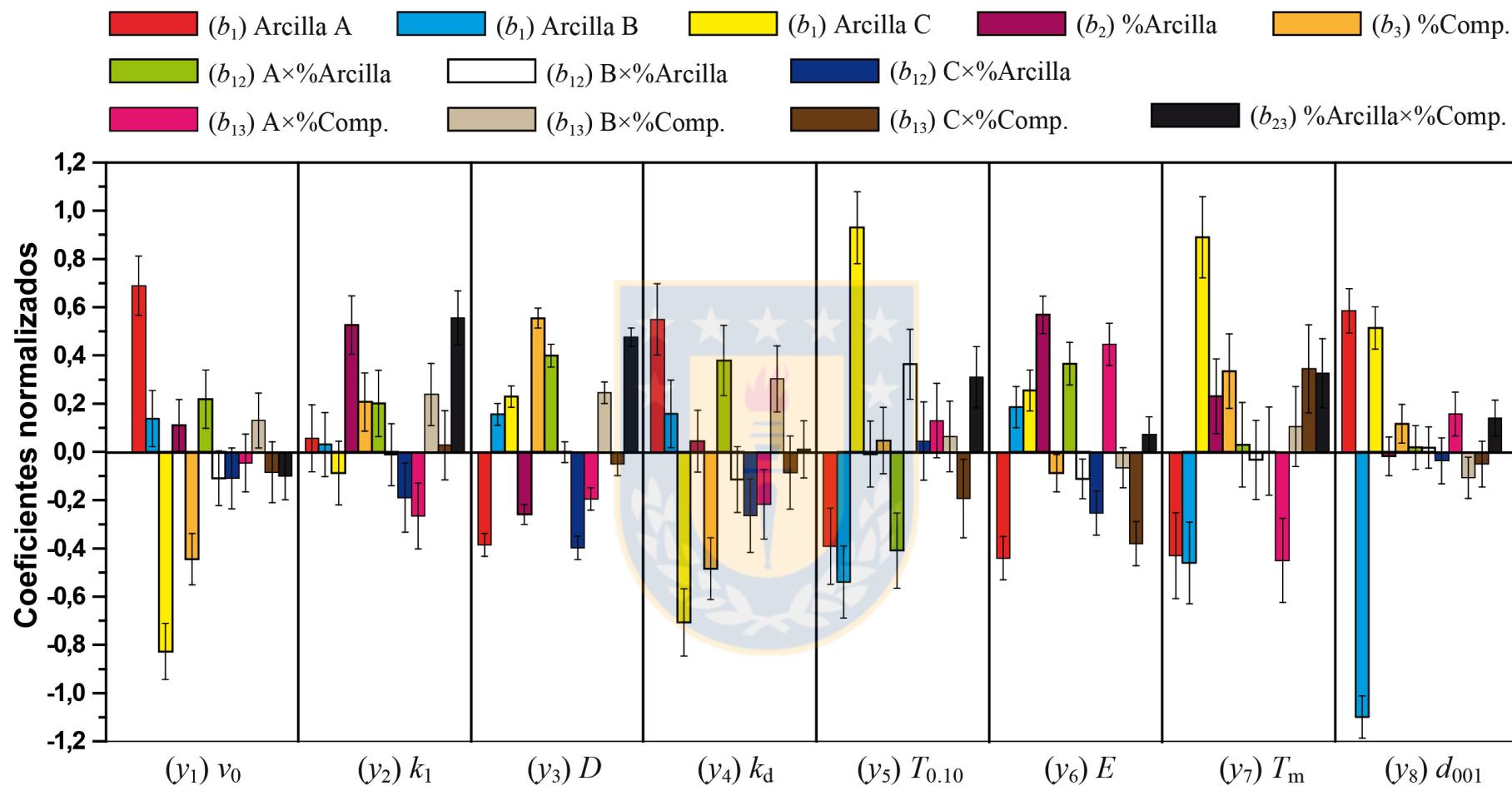


Figura 4.37. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos por PLSR (tras 7 PLS-componentes) para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta del diseño experimental D-optimal del estudio de liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM hacia simulador de alimento a 18 °C. A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

Se observa además en el gráfico de coeficientes que esta nanoarcilla I.44P está negativamente relacionada con la velocidad de liberación inicial v_0 y la constante de velocidad de difusión k_d , ya que los coeficientes de esta arcilla para estas respuestas son grandes y de signo negativo, lo que significa que v_0 y k_d disminuyen cuando esta arcilla es utilizada en la formulación, o sea, la presencia de la arcilla C controla la liberación de carvacrol haciendo más lenta su difusión. Esto se da a diferencia de lo que ocurre con las arcillas A y B (con octadecilamina, y con metil dihidroxietil octadecilamina como modificadores respectivamente) que hacen aumentar estos parámetros al tener coeficientes positivos y grandes para las respuestas v_0 y k_d . Esto puede deberse a que la mayor intercalación lograda con la arcilla C produce lo que se conoce como “camino tortuoso” producto de la delaminación de la nanoarcilla en la matriz polimérica (ver figura 4.38) lo que dificulta la migración del carvacrol y por tanto enlentece su liberación lo que se ve reflejado en los menores valores de v_0 y k_d , lo cual ocurre en menor grado con las arcillas A y B.

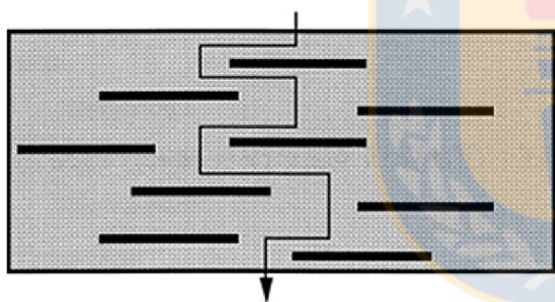


Figura 4.38. Modelo de “camino tortuoso” propuesto para explicar el efecto en la disminución de la velocidad de difusión de moléculas producto de la intercalación en nanocompuestos [72].

Estas dos respuestas, v_0 y k_d , están íntimamente ligadas lo que hace que los perfiles de coeficientes de regresión sean muy similares, y por tanto las diferentes variables afecten de manera similar estas respuestas. Esto se aprecia también en el gráfico de *loadings* (ver figura 4.39) en donde se pueden interrelacionar todas las respuestas y todas las variables al mismo tiempo. Aquí se aprecia que v_0 y k_d se ubican casi en las mismas coordenadas del gráfico.

Analizando como las variables influyen en el coeficiente de difusión D , se observa que el coeficiente de regresión para %Arcilla es negativo y grande, lo que se traduce en que a medida que aumenta la cantidad de arcilla en la formulación, D disminuye, lo que se debe a que pueda haber mayor cantidad de arcilla intercalada que dificulte la difusión del carvacrol. Esto puede respaldarse al analizar la fuerte interacción %Arcilla×%Comp cuyo análisis se puede hacer observando el gráfico de interacción (ver figura 4.40a).

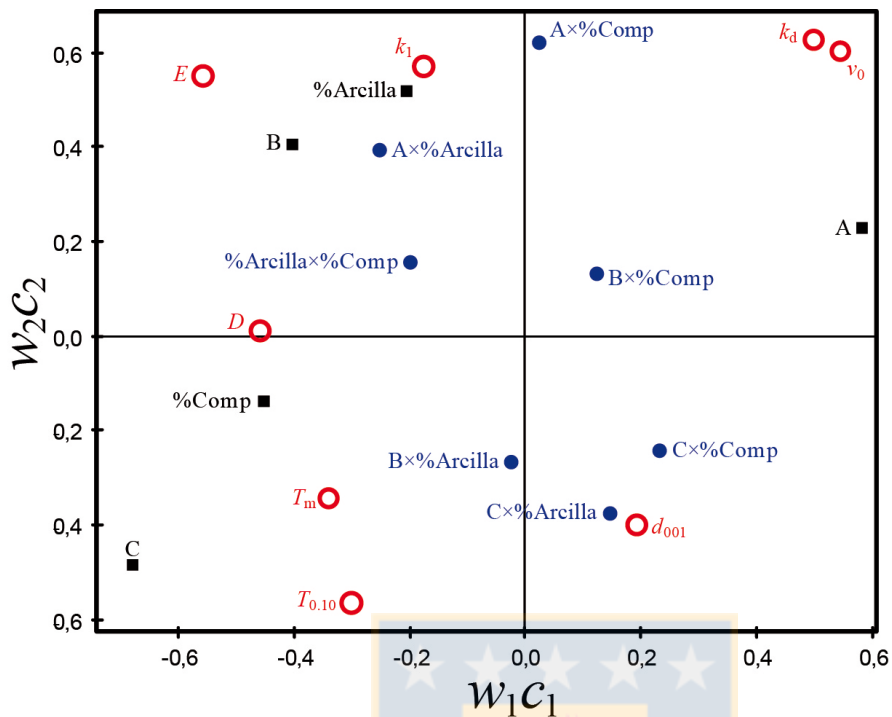


Figura 4.39. Gráfico de *loadings* del primer componente (w_1c_1) vs. *loadings* del segundo componente (w_2c_2) para el modelo PLSR del diseño D-optimal para liberación de carvacrol hacia simulador de alimento tras 7 PLS-componentes. (○) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

Se observa que para disminuir el valor de D se debe utilizar una proporción equilibrada de arcilla y compatibilizante (5 % y 4 % respectivamente), lo que se condice con lo encontrado en la optimización de PEBD/MOM en el diseño experimental de la sección 4.1.2, en donde se logran los mejores niveles de intercalación con proporciones similares de arcilla y compatibilizante. Así, analizando ahora la interacción C×%Arcilla (ver gráfico 4.40b) en la respuesta D , se observa que de las tres nanoarcillas utilizadas, la que realmente disminuye el coeficiente de difusión es la arcilla C, la cual debe utilizarse a un nivel alto de concentración equilibrado con una proporción similar de compatibilizante. Se puede resumir este análisis observando como éstas variables e interacciones de variables impactan en D en el gráfico de *loadings* de la figura 4.41c.

En el caso de k_1 , los coeficientes del tipo de arcilla no son significativos, pero sí aparece el impacto de la arcilla C y de la interacción C×%Arcilla al analizar el gráfico de *loadings* de la

figura 4.41b. Se aprecia ahí que las proyecciones de estas dos variables impactan negativamente en la respuesta, o sea, utilizando la arcilla C y en alta concentración, se disminuye el valor de k_1 .

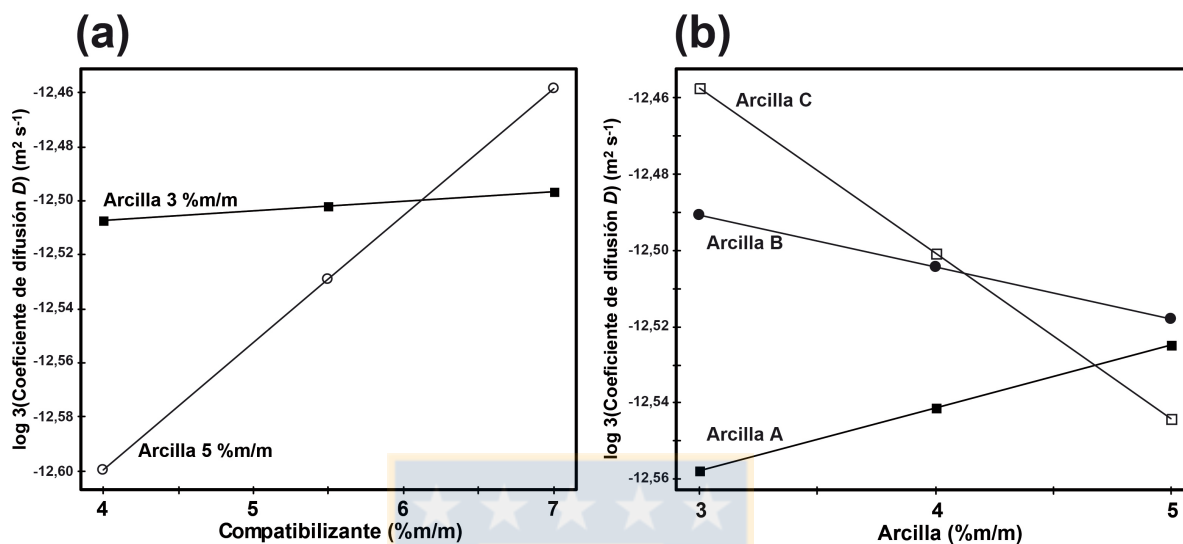


Figura 4.40. Gráfico de interacciones entre variables para la respuesta de coeficiente de difusión D para la liberación de carvacrol desde films de PEBD/MOM hacia simulador de alimento a 18 °C. (a) interacción entre %Arcilla y %Comp, (b) interacción entre Tipo de arcilla y %Arcilla. Arcilla A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); Arcilla B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxietyl octadecilamina); Arcilla C = Nanomer® I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

Interrelacionando tanto las respuestas de propiedades de empaque como las de liberación con la calibración multivariada por PLSR, se puede optimizar la formulación que maximice $T_{0.10}$, E , T_m y d_{001} , y que minimice v_0 , k_1 , D y k_d . Utilizando el método SIMPLEX se obtiene que el equilibrio entre estos dos tipos de respuestas se logra con la formulación: Arcilla C (Nanomer® I.44P con modificador dimetil dialquil (C14–C18) amina) en un 4,7 %m/m, y compatibilizante al 5,6 %m/m.

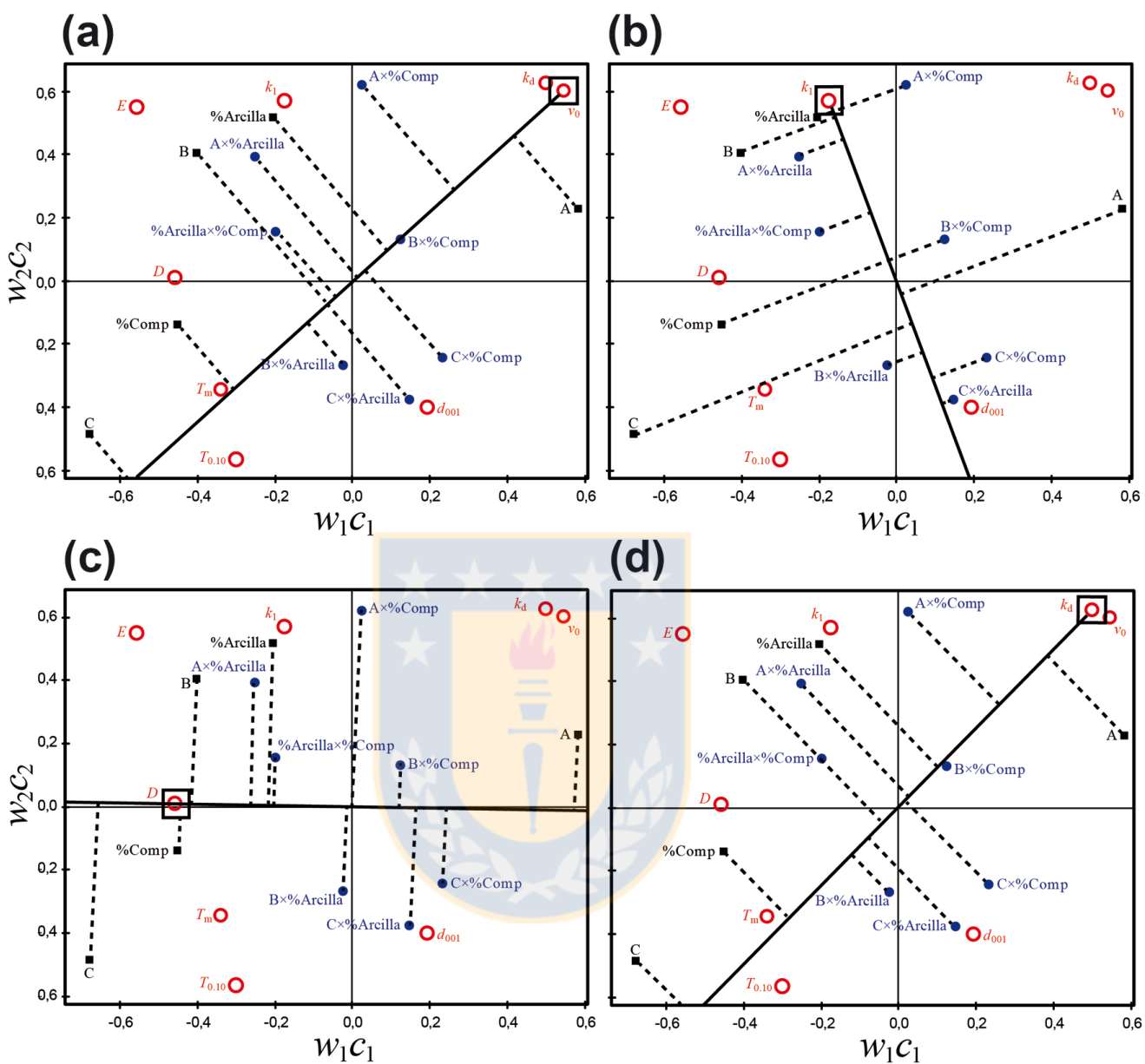


Figura 4.41. Interpretación del gráfico de *loadings* (primer componente (w_1c_1) vs. segundo componente (w_2c_2)) del modelo PLSR para las respuestas de cinética y difusión de carvacrol: (a) y_1 velocidad de liberación inicial v_0 , (b) y_2 constante de velocidad cinética total k_1 , (c) y_3 coeficiente de difusión D , y (d) y_4 constante de velocidad de difusión k_d . (○) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

4.3.3. Estudio de liberación de carvacrol desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM hacia simulador de alimento.

Tras la optimización de las formulaciones de films de bionanocompuestos de ATP/MOM que poseían las propiedades de empaque apropiadas, y calculada la concentración de carga de carvacrol CI_{50} *in vitro* para *Botrytis cinerea*, se procedió a realizar un diseño experimental para evaluar y optimizar las variables que pueden influir en la liberación de carvacrol desde estos bionanocompuestos. Los parámetros de proceso óptimos para las propiedades de empaque de acuerdo a los estudios mostrados previamente son: proporción glicerina/agua = 25/75, $T_{mix} = 110$ °C, y $v_{mix} = 50$ rpm. La carga de carvacrol en la formulación fue la CI_{50} *in vitro* es de 2,0 % m/m de carvacrol en la formulación final.

Las variables a estudiar para evaluar la liberación de carvacrol desde los films de ATP/MOM fueron: (x_1) tipo de nanoarcilla, (x_2), cantidad de nanoarcilla en la formulación, y (x_3) cantidad de plastificante. Los niveles a estudiar para estas variables se detallan en la tabla 4.24.

Tabla 4.24. Diseño D-óptimo para el estudio de liberación de carvacrol hacia simulador de alimento desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.

Variables cualitativas x	Nivel		
	A	B	C
x_1 Tipo de nanoarcilla (Nanomer [®]) ^a	I.30E	I.34TCN	Montmorillonita
Variables cuantitativas x	Valores codificados		
	-1	0	+1
x_2 %Arcilla (%m/m)	3,0	4,5	6,0
x_3 %Plast. ^b (%m/m)	30,0	35,0	40,0

^a A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

^b Proporción de plastificante 25:75 glicerina:agua.

Al tener que evaluar la variable cualitativa de tipo de arcilla, se eligió trabajar también con un diseño D-óptimo. Teniendo las variables a estudiar junto a sus respectivos niveles, mediante algoritmos iterativos se obtuvo un set de diseños, de los cuales se escogió el diseño definitivo que logró maximizar el área experimental a abarcar y a la vez minimizar el número de experimentos. El software arrojó cinco candidatos de diseños generados computacionalmente, y el escogido constó de 15 experimentos más 3 puntos centrales (triplicado) para los cálculos de varianza. La tabla 4.25 muestra los criterios estadísticos del diseño D-óptimo utilizado. Este

diseño posee un número de condición de 2,36 lo cual refleja una esfericidad y simetría aceptable en el diseño, además posee un valor de G-efficiency de 82,3 % que es la comparación o la performance del diseño comparado con el área abarcada por un diseño equivalente de tipo factorial completo de 3 niveles.

Tabla 4.25. Resultado estadístico del diseño experimental generado por D-optimal usado para evaluar las variables que influyen en la liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de ATP/MOM hacia simulador de alimento.

Criterio estadístico	Valor
Objetivo	<i>Screening</i>
Tipo de modelo	Interacción
G-efficiency	82,35 %
log (Determinante de $X'X$)	10,1476
Log normalizado (Determinante de $X'X$)	-0,161336
Número de condición	2,36971

Al realizar los estudios de liberación de carvacrol desde los films de bionanocompuestos de ATP/MOM hacia el simulador de alimento, se produce una interacción del almidón termoplástico con la solución acuosa que produce un hinchamiento y generación de microfisuras en el film, que con el tiempo se llega, incluso a microdesintegraciones graduales. Este comportamiento resulta en una difusión no Fickiana del carvacrol hacia el simulador de alimento, no siendo posible calibrar el efecto de las variables estudiadas sobre la respuesta de la liberación en este tipo de simuladores de alimentos de tipo acuoso. Esto indica que para este tipo de simulador de alimentos no es recomendable medir y calibrar la liberación del carvacrol, ya que se genera una liberación de tipo *burst* como se aprecia en la figura 4.42.

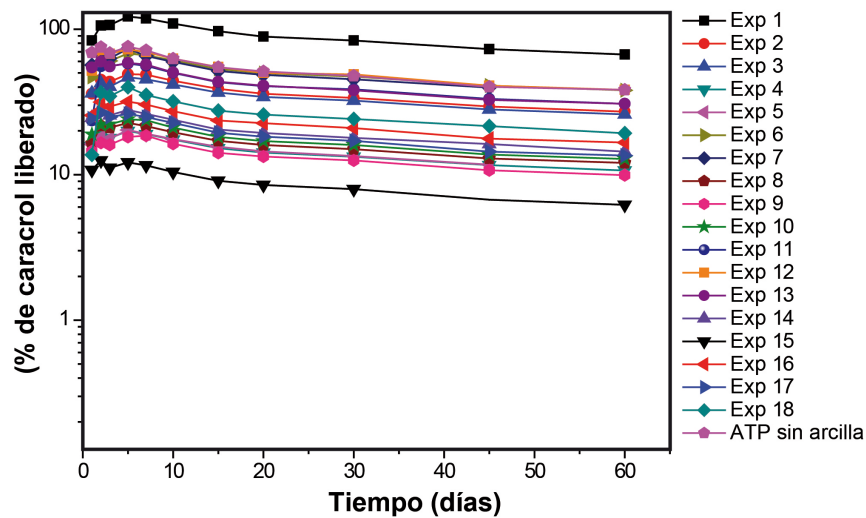


Figura 4.42. Liberación de carvacrol desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM hacia simulador de alimentos a temperatura ambiente.

4.3.4. Estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM por volatilización hacia el ambiente

Para efectuar los estudios de pérdida de principio activo por volatilización al ambiente se tomaron como muestra pequeños trozos de film dejados al ambiente para medir la cantidad de carvacrol remanente, por lo que se asume que la concentración de principio activo a lo largo de todo el film es homogénea y la zona de muestreo no es una fuente de variación significativa que afecte el estudio. Para validar este supuesto se realizó un estudio de homogeneidad de contenido de carvacrol en los films de nano/bionanocompuestos. La tabla 4.26 muestra que tomando muestras de un film de 200 mm de diámetro en ocho zonas diferentes, la concentración de carvacrol no muestra diferencia significativa al aplicar el test de Kruskal-Wallis sobre las concentraciones encontradas en cada zona muestreada, por lo que se asume homogeneidad de contenido de carvacrol a lo largo del film ($p < 0,05$).

Tabla 4.26. Estudio de homogeneidad de contenido de carvacrol en films nano/bionanocompuestos.

	PEBD/MOM	ATP/MOM
Valor de p	0,01	0,05
Número de grupos	8	8
Estadístico Kruskal-Wallis	12,07	13,95
¿Diferencia significativa de las medias? ($p < 0,05$)	No	No

Para evaluar la pérdida de carvacrol desde los films expuestos a temperatura ambiente, se midió la concentración remanente de carvacrol en muestreos de film a intervalos de tiempo desde su síntesis hasta 60 días después. En el gráfico 4.43a se observa que la reducción de la concentración de carvacrol en los films de PEBD/MOM sigue una cinética de primer orden, la cual está dada por la ecuación (15)

$$\ln(C) = -kt \quad (15)$$

donde C es la retención de carvacrol a tiempo t , y k es la constante de velocidad. La ecuación (15) es el modelo cinético que se aplicará a este tipo de estudios de pruebas de vida útil (ASLT) [129].

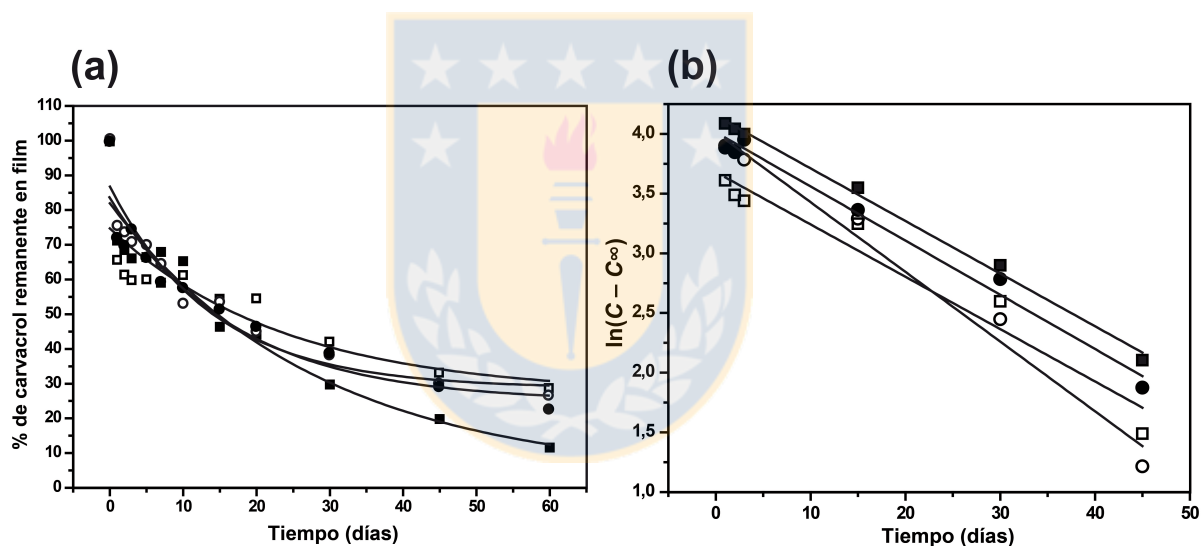


Figura 4.43. (a) Gráfico de % de carvacrol remanente en films de nanocompuestos vs. tiempo, (b) gráfico $\ln(C - C_\infty)$ vs. tiempo. Formulaciones con 7 %m/m de Comp y (□) 3 %m/m Nanomer[®]I.30E (●) 3 %m/m Nanomer[®]I.34TCN (○) 3 %m/m Nanomer[®]I.44P (■) PEBD sin nanoarcilla.

De esta ecuación se obtiene la ecuación (16)

$$\ln(C - C_\infty) = -kt \quad (16)$$

en donde C_∞ es la concentración retenida de carvacrol en el film al alcanzar el equilibrio (“tiempo infinito”), y que al graficar $\ln(C - C_\infty)$ vs. t (ver figura 4.43b), se obtiene una línea

recta cuya pendiente es k , y que sumado a la ecuación (17) se obtiene $\theta_{1/2}$, que es el tiempo requerido para que la concentración del principio activo en el film disminuya a la mitad del valor inicial.

$$\theta_{1/2} = \ln(2)/-k \quad (17)$$

A partir de las mismas muestras del diseño experimental D-optimal realizado para los estudios de liberación a simulador de alimento (sección 4.3.2), se evaluó si las variables que controlan la liberación por difusión hacia simulador de alimento son las mismas que rigen la pérdida de carvacrol por volatilización al medio ambiente. Tras una análisis preliminar de los gráficos de la figura 4.43 en donde se toman tres experimentos con diferentes tipos de nanoarcillas (a igual concentración de nanoarcilla y compatibilizante) se puede ya deducir que también la nanoarcilla influye en la volatilización de carvacrol al ambiente al compararse con el PEBD solo.

Para evaluar los perfiles de pérdida de carvacrol a corto y largo plazo, y como influyen las variables estudiadas, se calcularon las cantidades de carvacrol remanente en film a 3, 5, 10, 45 y 60 días para los 18 experimentos del diseño D-optimal, y se sometieron a calibración multivariada PLSR para correlacionar estas respuestas con las variables. En la tabla 4.27 se muestran los datos experimentales junto a los datos de propiedades de empaque.

La tabla 4.28 muestra la evaluación del modelo obtenido por calibración con PLSR a partir de los resultados experimentales de las nueve respuestas medidas, cuyo polinomio es el expresado en la ecuación (14). Se observa que después de 8 PLS-componentes, el modelo de regresión postulado posee un $R^2 = 0,928$ y $Q^2 = 0,272$, lo que es satisfactorio teniendo en cuenta que se están calibrando tres variables con nueve respuestas simultáneamente. Los valores de R^2 individuales para cada respuesta van desde $R^2 = 0,831$ a $0,984$, y un rango de Q^2 de $0,084$ a $0,822$ lo que se considera satisfactorio para utilizar el modelo con confianza.

Tabla 4.27. Datos experimentales del diseño D–optimal para el estudio de pérdida de carvacrol por volatilización desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.

Exp. ^a	Variables			Respuestas								
	x_1 Tipo de arcilla ^b	x_2 %Arcilla (%m/m)	x_3 %Comp. (%m/m)	y_1 ln(C) 3 ^{er} día ^c	y_2 ln(C) 5 ^o día	y_3 ln(C) 10 ^o día	y_4 ln(C) 45 ^o día	y_5 ln(C) 60 ^o día	y_6 $T_{0,10}$ (°C)	y_7 E (MPa)	y_8 T_m (°C)	y_9 d_{001} (nm)
1	A	3,0 (-1) ^d	4,0 (-1)	– ^e	–	–	–	–	436,1	314,3	112,9	34,932
2	A	3,0 (-1)	4,0 (-1)	4,3899	4,2922	4,2269	3,7706	3,6296	442,1	306,3	112,7	37,817
3	A	5,0 (+1)	4,0 (-1)	4,4031	4,2467	4,0746	3,7658	3,4453	–	366,5	112,1	34,146
4	A	3,0 (-1)	7,0 (+1)	4,0938	4,0976	4,1178	3,5037	3,3605	430,2	339,5	111,4	41,487
5	A	5,0 (+1)	7,0 (+1)	4,2733	4,1640	4,0642	3,5746	3,4267	432,8	392,7	112,8	40,612
6	B	3,0 (-1)	4,0 (-1)	4,2279	4,0694	3,9104	3,3694	3,1638	421,1	363,3	112,0	17,780
7	B	5,0 (+1)	4,0 (-1)	3,9495	4,0146	3,8661	3,1189	3,1971	425,2	376,0	–	17,223
8	B	3,0 (-1)	7,0 (+1)	4,3137	4,1974	4,0562	3,3759	3,1239	414,1	364,0	112,3	17,549
9	B	5,0 (+1)	7,0 (+1)	4,3083	4,2282	4,1367	3,4958	3,2481	401,9	383,5	111,6	–
10	B	5,0 (+1)	7,0 (+1)	4,2610	4,2696	4,1315	–	3,3265	–	382,0	112,4	17,475
11	C	3,0 (-1)	4,0 (-1)	4,2337	4,2155	4,0826	3,5389	3,3884	446,8	382,0	113,0	35,233
12	C	5,0 (+1)	4,0 (-1)	4,3154	4,2767	4,1765	3,6850	3,5369	449,8	396,0	112,9	34,941
13	C	3,0 (-1)	7,0 (+1)	4,2558	4,2435	3,9673	3,3975	3,2777	447,1	344,7	113,9	35,370
14	C	3,0 (-1)	7,0 (+1)	4,1669	4,1764	–	3,4694	3,3382	442,9	344,5	113,2	36,746
15	C	5,0 (+1)	7,0 (+1)	4,3311	4,2989	4,1097	3,6391	3,6451	442,8	377,7	114,6	34,541
16	C	4,0 (0)	5,5 (0)	–	–	–	3,5935	3,3585	445,8	369,5	113,9	37,377
17	C	4,0 (0)	5,5 (0)	4,2917	4,2645	4,1087	3,5356	3,3738	449,1	381,0	113,2	35,544
18	C	4,0 (0)	5,5 (0)	4,3382	4,2899	–	–	3,5759	440,8	369,0	113,1	34,211

^a Experimentos en el diseño.

^b A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

^c ln(C) para la concentración de carvacrol remanente encontrado en la muestra de film a tiempo t .

^d Valores codificados para las variables.

^e Valores excluidos o perdidos.

Tabla 4.28. Evaluación del modelo obtenido del diseño experimental D-optimal tras 8 PLS-componentes para el estudio de la pérdida de carvacrol por volatilización al ambiente desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.

Parámetro del modelo	Respuestas									Total
	3 ^{er} día	5 ^o día	10 ^o día	45 ^o día	60 ^o día	$T_{0,10}$	E	T_m	d_{001}	
R^2	0,906	0,929	0,984	0,937	0,844	0,936	0,981	0,831	0,969	0,928
Q^2	0,321	0,479	0,822	0,295	0,415	0,314	0,676	0,084	0,555	0,272
Validez del modelo	0,698	0,788	0,434	0,647	0,937	0,491	0,809	0,587	0,504	
Reproducibilidad	0,840	0,842	0,999	0,925	0,640	0,914	0,960	0,720	0,965	
Número de condición										2,331

Los gráficos de valores predichos por el modelo vs. los valores experimentales se muestran en la figura 4.44, y la tabla A.7 (ver Anexo A) muestra la significancia estadística del modelo para cada respuesta y tras la aplicación de test ANOVA. Los gráfico de *scores u* vs. *t* para los primeros cuatro PLS-componente (ver figura 4.45) muestran una correlación y homogeneidad satisfactoria en los datos experimentales, estando las variables y las respuestas de los experimentos correlacionadas con $R^2 > 0,66$ para estos cuatro primeros PLS-componentes, desde los cuales se puede extraer información confiable. La descripción de las relaciones entre variables, interacciones entre variables, y las respuestas se representa mediante los coeficientes de regresión del modelo que se entregan en la tabla 4.29 y se esquematizan gráficamente en la figura 4.46.

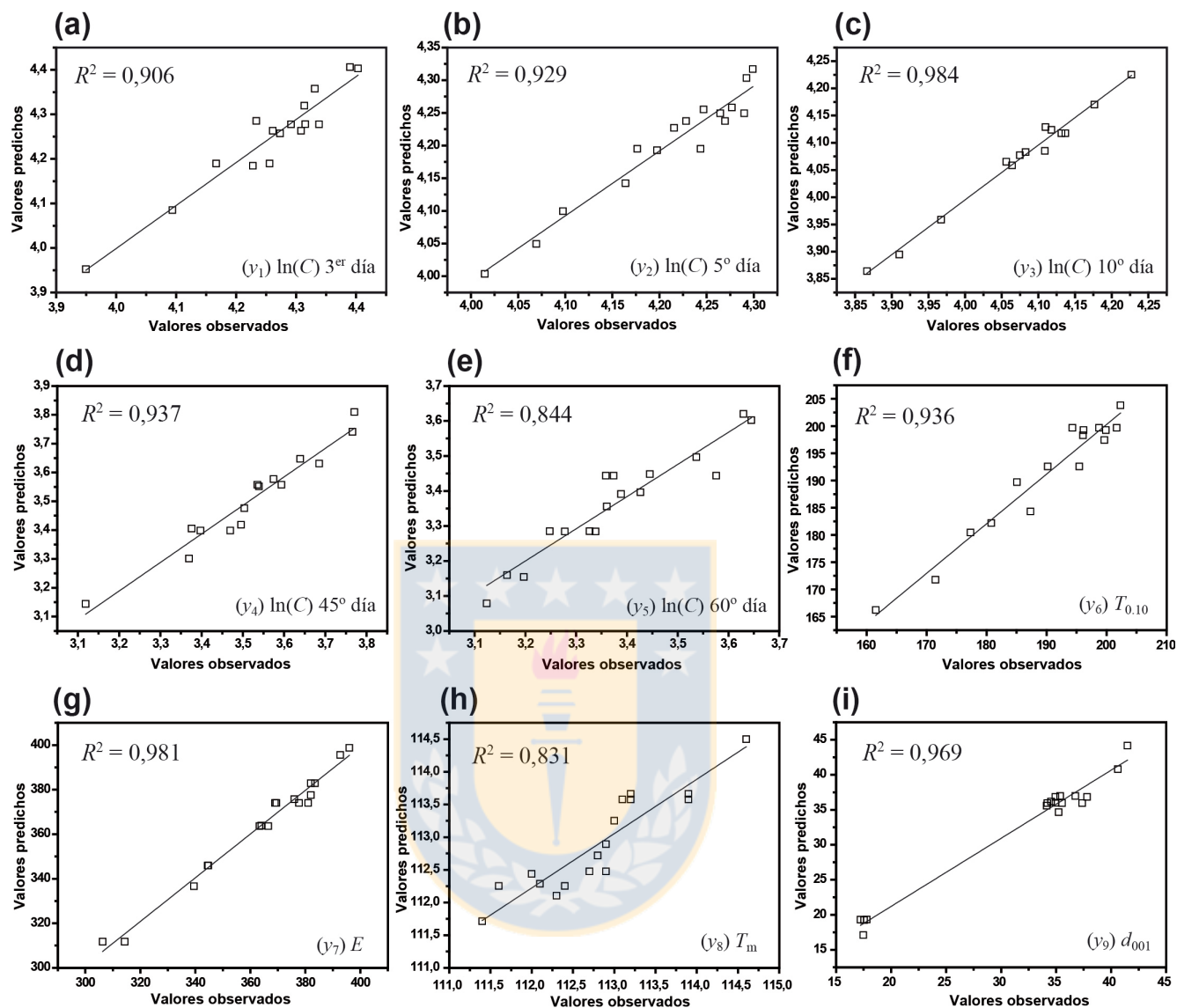


Figura 4.44. Gráficos de valores observados vs. valores predichos por PLSR (tras 8 PLS-componentes) para estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C. (a) y_1 ln de % de retención de carvacrol al 3^{er} día, (b) y_2 ln de % de retención de carvacrol al 5^o día, (c) y_3 ln de % de retención de carvacrol al 10^o día, (d) y_4 ln de % de retención de carvacrol al 45^o día, y (e) y_5 ln de % de retención de carvacrol al 60^o día, (f) y_6 temperatura de descomposición $T_{0,10}$ con transformación y^2 , (g) y_7 módulo de Young E , (h) y_8 temperatura de fusión T_m , e (i) y_9 distancia interlamilar d_{001} .

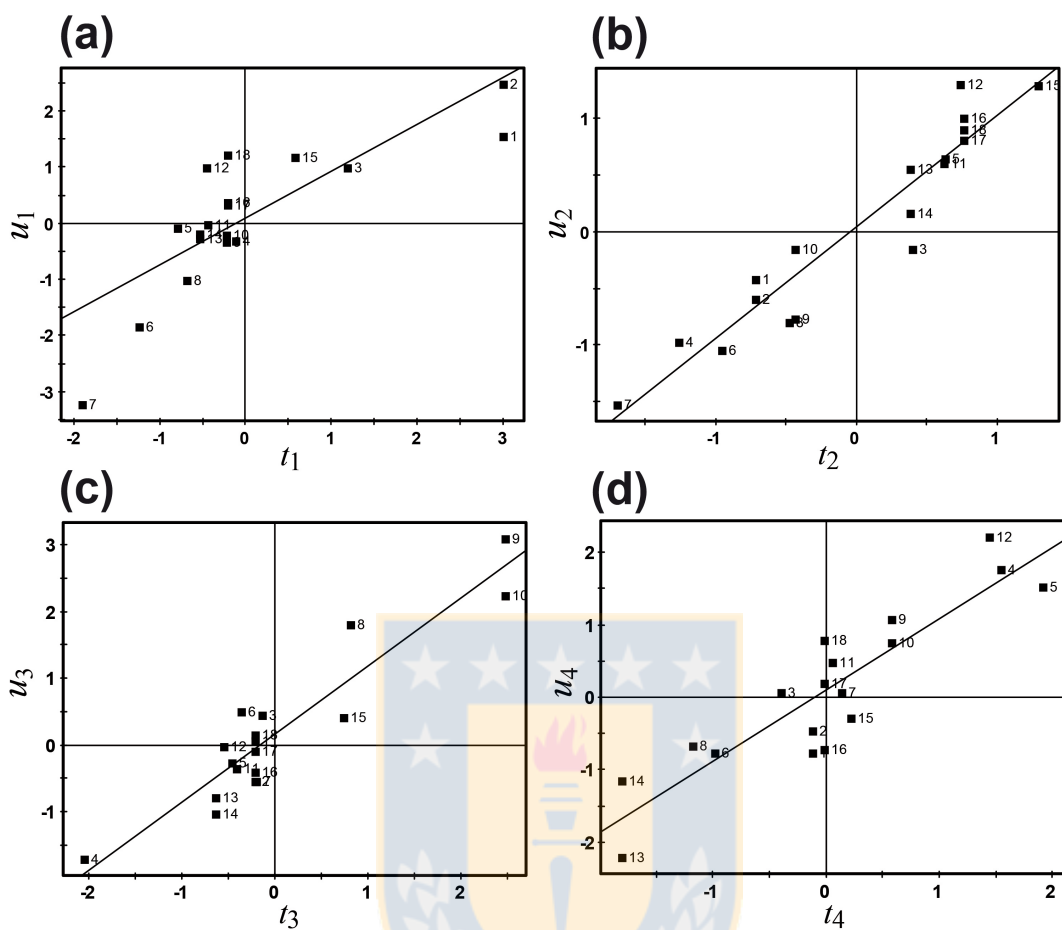


Figura 4.45. Gráficos de *scores* u vs. t obtenidos por PLSR para el diseño experimental D-optimal para el estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C para los primeros cuatro PLS-componentes. (a) primer componente $R^2 = 0,659$, (b) segundo componente $R^2 = 0,903$, (c) tercer componente $R^2 = 0,865$, (d) cuarto componente $R^2 = 0,808$. Cada punto en el gráfico corresponde a un experimento del diseño.

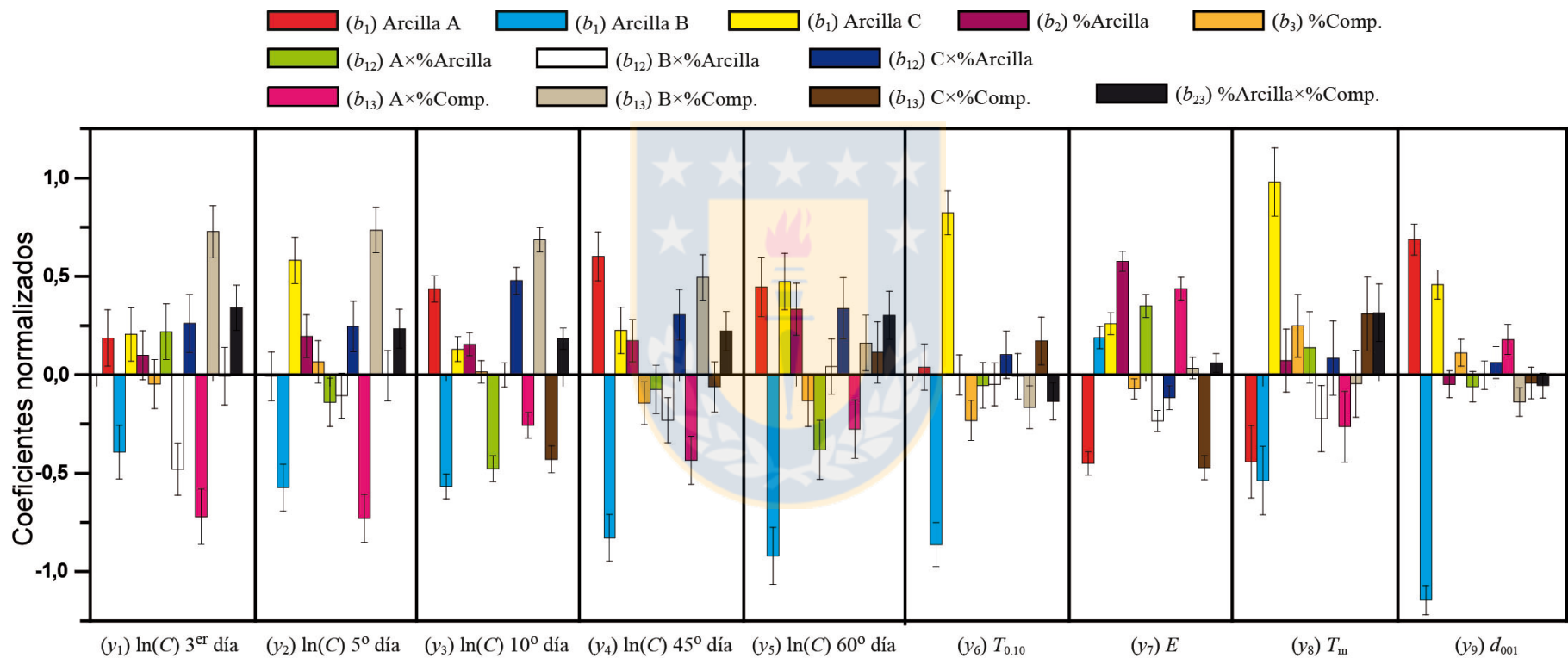


Figura 4.46. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos por PLSR (tras 8 PLS-componentes) para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta del diseño experimental D-optimal para el estudio de pérdida de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C a diferente tiempo. Arcilla A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

Tabla 4.29. Coeficientes de regresión normalizados (*b*) calculados tras 8 PLS-componentes para el estudio de pérdida de carvacrol en films de nanocompuestos de PEBD/MOM a 18 °C.

Término del polinomio	y_1 ln(C) 3 ^{er} día ^c	y_2 ln(C) 5 ^o día ^c	y_3 ln(C) 10 ^o día ^c	y_4 ln(C) 45 ^o día ^c	y_4 ln(C) 60 ^o día ^c	y_5 $T_{0.10}$	y_6 E	y_7 T_m	y_8 d_{001}
constante b_0	37,55 ± 0,10 ^a $p = 0,000$	49,30 ± 0,09 $p = 0,000$	41,09 ± 0,04 $p = 0,000$	20,88 ± 0,08 $p = 0,000$	21,81 ± 0,12 $p = 0,000$	16,03 ± 0,08 $p = 0,000$	14,59 ± 0,05 $p = 0,000$	135,6 ± 0,14 $p = 0,000$	3,785 ± 0,060 $p = 0,000$
b_1 Arcilla A ^b	0,187 ± 0,143 $p = 0,227$	-0,007 ± 0,124 $p = 0,954$	0,437 ± 0,067 $p = 0,000$	0,602 ± 0,124 $p = 0,001$	0,447 ± 0,152 $p = 0,019$	0,040 ± 0,118 $p = 0,745$	-0,450 ± 0,059 $p = 0,000$	-0,441 ± 0,184 $p = 0,043$	0,687 ± 0,078 $p = 0,000$
b_1 Arcilla B ^b	-0,392 ± 0,136 $p = 0,021$	-0,574 ± 0,118 $p = 0,001$	-0,567 ± 0,064 $p = 0,000$	-0,828 ± 0,118 $p = 0,000$	-0,921 ± 0,145 $p = 0,000$	-0,862 ± 0,112 $p = 0,000$	0,190 ± 0,056 $p = 0,010$	-0,537 ± 0,175 $p = 0,015$	-1,145 ± 0,075 $p = 0,000$
b_1 Arcilla C ^b	0,205 ± 0,136 $p = 0,169$	0,581 ± 0,118 $p = 0,001$	0,130 ± 0,063 $p = 0,073$	0,226 ± 0,118 $p = 0,091$	0,473 ± 0,144 $p = 0,011$	0,823 ± 0,111 $p = 0,000$	0,260 ± 0,056 $p = 0,002$	0,978 ± 0,174 $p = 0,000$	0,458 ± 0,074 $p = 0,000$
b_2 %Arcilla	0,099 ± 0,125 $p = 0,449$	0,196 ± 0,108 $p = 0,107$	0,156 ± 0,058 $p = 0,028$	0,173 ± 0,108 $p = 0,149$	0,333 ± 0,132 $p = 0,035$	-0,000 ± 0,102 $p = 0,997$	0,576 ± 0,051 $p = 0,000$	0,073 ± 0,159 $p = 0,661$	-0,048 ± 0,068 $p = 0,498$
b_3 %Comp.	-0,047 ± 0,125 $p = 0,715$	0,066 ± 0,108 $p = 0,561$	0,015 ± 0,058 $p = 0,801$	-0,144 ± 0,108 $p = 0,219$	-0,131 ± 0,132 $p = 0,350$	-0,232 ± 0,102 $p = 0,053$	-0,071 ± 0,051 $p = 0,202$	0,249 ± 0,159 $p = 0,157$	0,112 ± 0,068 $p = 0,138$
b_{12} Arcilla A×%Arcilla	0,219 ± 0,141 $p = 0,160$	-0,140 ± 0,123 $p = 0,288$	-0,477 ± 0,066 $p = 0,000$	-0,075 ± 0,123 $p = 0,560$	-0,380 ± 0,150 $p = 0,035$	-0,054 ± 0,116 $p = 0,656$	0,350 ± 0,058 $p = 0,000$	0,138 ± 0,181 $p = 0,466$	-0,061 ± 0,077 $p = 0,455$
b_{12} Arcilla B×%Arcilla	-0,480 ± 0,132 $p = 0,007$	-0,106 ± 0,115 $p = 0,382$	-0,001 ± 0,062 $p = 0,992$	-0,231 ± 0,115 $p = 0,079$	0,043 ± 0,140 $p = 0,768$	-0,049 ± 0,108 $p = 0,666$	-0,234 ± 0,054 $p = 0,003$	-0,222 ± 0,169 $p = 0,225$	-0,002 ± 0,072 $p = 0,982$
b_{12} Arcilla C×%Arcilla	0,261 ± 0,147 $p = 0,115$	0,246 ± 0,128 $p = 0,091$	0,478 ± 0,069 $p = 0,000$	0,305 ± 0,128 $p = 0,044$	0,338 ± 0,156 $p = 0,062$	0,102 ± 0,121 $p = 0,423$	-0,116 ± 0,061 $p = 0,092$	0,084 ± 0,189 $p = 0,668$	0,062 ± 0,080 $p = 0,461$
b_{13} Arcilla A×%Comp.	-0,721 ± 0,140 $p = 0,001$	-0,730 ± 0,122 $p = 0,000$	-0,256 ± 0,065 $p = 0,004$	-0,434 ± 0,122 $p = 0,007$	-0,276 ± 0,149 $p = 0,100$	-0,007 ± 0,115 $p = 0,952$	0,438 ± 0,058 $p = 0,000$	-0,263 ± 0,180 $p = 0,181$	0,179 ± 0,077 $p = 0,047$
b_{13} Arcilla B×%Comp.	0,727 ± 0,133 $p = 0,001$	0,735 ± 0,115 $p = 0,000$	0,685 ± 0,062 $p = 0,000$	0,495 ± 0,115 $p = 0,003$	0,162 ± 0,141 $p = 0,284$	-0,164 ± 0,109 $p = 0,171$	0,034 ± 0,055 $p = 0,551$	-0,046 ± 0,170 $p = 0,793$	-0,138 ± 0,073 $p = 0,094$
b_{13} Arcilla C×%Comp.	-0,007 ± 0,146 $p = 0,964$	-0,006 ± 0,128 $p = 0,966$	-0,429 ± 0,069 $p = 0,000$	-0,061 ± 0,128 $p = 0,644$	0,114 ± 0,156 $p = 0,485$	0,172 ± 0,121 $p = 0,194$	-0,472 ± 0,061 $p = 0,000$	0,309 ± 0,189 $p = 0,139$	-0,041 ± 0,080 $p = 0,620$
b_{23} %Arcilla×%Comp.	0,340 ± 0,115 $p = 0,018$	0,234 ± 0,100 $p = 0,047$	0,184 ± 0,054 $p = 0,009$	0,222 ± 0,100 $p = 0,056$	0,302 ± 0,122 $p = 0,038$	-0,136 ± 0,094 $p = 0,189$	-0,061 ± 0,047 $p = 0,233$	0,315 ± 0,147 $p = 0,065$	-0,054 ± 0,063 $p = 0,411$

^a Coeficiente de regresión normalizado ± error estándar, incluido el valor de p .

^b A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

^c ln(C) del % de retención de carvacrol remanente encontrado en la muestra de film a tiempo t .

Al graficar todas las variables y sus interacciones junto a las respuestas medidas a través del gráfico de *loadings* de los primeros dos PLS-componentes (ver figura 4.47a) se puede apreciar que las respuestas de porcentaje de retención de carvacrol a los diferentes tiempos se agrupan relativamente cerca unas de otras en un solo cuadrante del gráfico (encerradas en círculo rojo). Se observa que la respuesta d_{001} (encerrada en círculo azul) está cerca de las respuestas de % retención, esto indica que la retención de carvacrol en el film está directa y positivamente ligada a la intercalación del nanocompuesto, lo que respalda el modelo de “camino tortuoso” descrito en la sección 4.3.2, por lo que se deduce que a mayor intercalación, menor volatilización de carvacrol desde el film. Además, la interacción %Arcilla×%Comp tiene un coeficiente importante y de signo positivo para estas respuestas (ver gráfico 4.46) ya que se encuentra también cerca de estas respuestas de retención en el primer gráfico de *loadings*, lo que confirma que al igual que en la liberación hacia el simulador de alimento, para optimizar la retención de carvacrol se debe tener en la formulación una proporción equilibrada de nanoarcilla y compatibilizante cercana a 1:1 para aumentar la intercalación y así la retención de carvacrol [116].

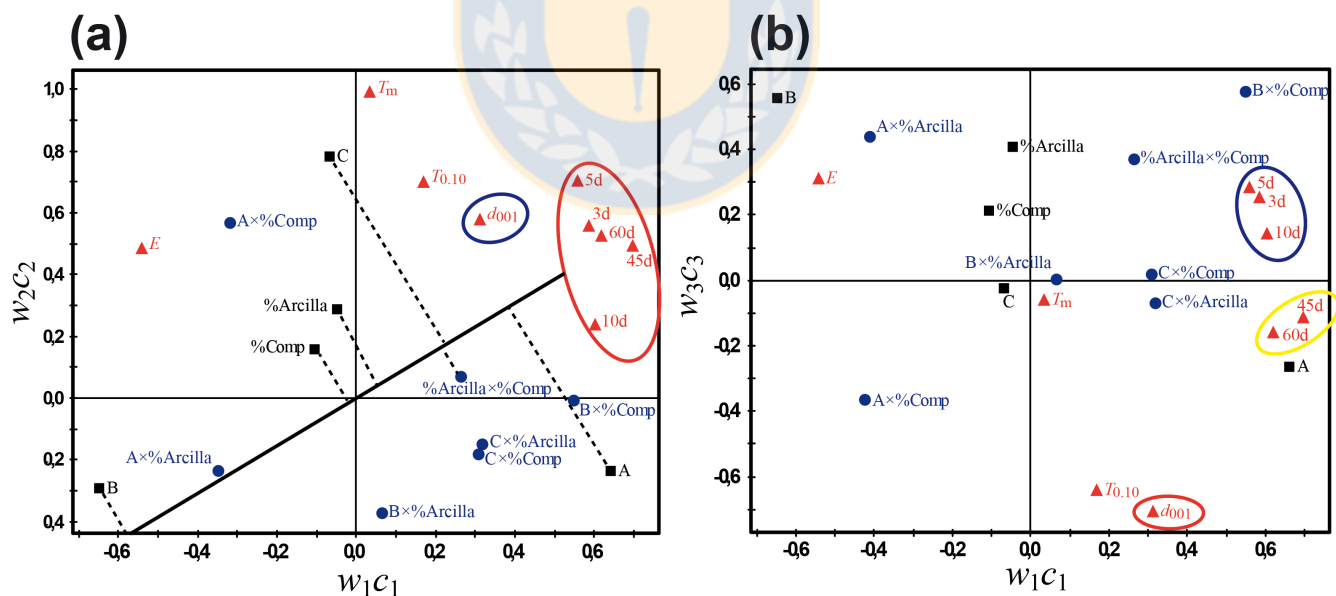


Figura 4.47. (a) Gráfico de *loadings* del primer componente (w_1c_1) vs. *loadings* del segundo componente (w_2c_2) y (b) gráfico de *loadings* del primer componente (w_1c_1) vs. *loadings* del tercer componente (w_3c_3) para el modelo obtenido del diseño D-óptimo tras 8 PLS-componentes para evaluar pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente. (▲) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxiethyl octadecilamina); C = Nanomer® I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

El control de liberación de carvacrol en los nanocompuestos aparte de ser regulado por los “caminos tortuosos” de la matriz intercalada, también se debe a la interacción entre la nanoarcilla y el carvacrol. El mecanismo de interacción entre las nanoarcillas y las moléculas migratorias en los nanocompuestos es debido principalmente a la adsorción, en este caso del carvacrol, con las capas y el organomodificador de la nanoarcilla. Este fenómeno de adsorción se encuentra gobernado principalmente por interacciones hidrofóbicas (van der Waals) con las cadenas de modificador orgánico de la nanoarcilla, como también por interacción con los bordes de la arcilla por enlaces puentes de hidrógeno con los hidroxilos de presentes ahí [90].

El primer gráfico de *loadings* muestra que las tres nanoarcillas evaluadas tienen diferente impacto en las respuestas de retención. Se observa que en el lado opuesto de las respuestas de retención se encuentra la Arcilla B (denotada por la letra B). Esto indicaría que este tipo de nanoarcilla (con modificador metil dihidroxietil octadecilamina) tiene un efecto negativo en la retención de carvacrol, o sea, permite una menor retención y por tanto una pérdida más rápida de carvacrol desde el film. Las arcillas A y C (con modificador octadecilamina, y dimetil dialquil (C14–C18) amina respectivamente) son las que se relacionarían positivamente con la retención de carvacrol, o sea, estas nanoarcillas cuando están presentes en la formulación, aumentan la retención de carvacrol y así disminuye la velocidad de su volatilización desde los films. Ambas nanoarcillas tienen diferentes coordenadas en el gráfico de *loadings*, lo que indica que a pesar de que ambas tienen un efecto positivo hacia la retención de carvacrol, hay diferencias en la afinidad del carvacrol con ambas nanoarcillas. La línea de proyección de la Arcilla A (octadecilamina) indica que influye mayormente en la retención de carvacrol, comparado con la Arcilla C (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

Estas diferencias en el control de liberación *per se* por parte de las distintas nanoarcillas es difícil de separar del efecto de la intercalación, ya que las tres arcillas muestran distintos efectos en la intercalación, lo que está directamente relacionado con el efecto “camino tortuoso” por lo que ambos factores – tipo de nanoarcilla e intercalación – se solapan. Para evidenciar las diferencias de interacción *per se* entre las nanoarcillas y el carvacrol por fenómeno de adsorción, se puede estudiar con detención el segundo gráfico de *loadings* (ver figura 4.47b) el cual posee información aportada por el tercer PLS-componente.

Aquí se observa que el *cluster* de las respuestas de retención se separa en dos grupos, uno de control de liberación de carvacrol a corto plazo (encerrados en azul) y el otro de control de

liberación a largo plazo (encerrado en amarillo). La separación de las respuestas de retención en estos dos grupos puede deberse a que la liberación a corto plazo esté más dominada por la interacción nanoarcilla/carvacrol, y la liberación a largo plazo al efecto “camino tortuoso”. A corto plazo el control de la liberación podría deberse a que el carvacrol está adsorbido en la nanoarcilla y una vez “despegado” de las láminas comienza su migración en zig-zag por la matriz tortuosa debido a la intercalación de las láminas, generando el control de la liberación a largo plazo.

La figura 4.48 presenta las proyecciones de las variables Arcilla en el segundo gráfico de *loadings*, que ayuda mejor a entender esta interpretación. Se aprecia que las respuestas de retención a largo plazo (encerradas en amarillo) están en el mismo cuadrante y más cerca de la respuesta d_{001} que las respuestas de retención a corto plazo (encerradas en azul), lo que interrelacionaría estas dos respuestas. Por otro lado, las variables %Arcilla y %Arcilla×%Comp impactan de manera positiva a las respuestas de retención a corto plazo, estando las intersecciones de sus proyecciones en el mismo cuadrante que estas respuestas, y para las respuestas de retención a largo plazo sus intersecciones están más lejanas, y por tanto con menor impacto sobre ellas.

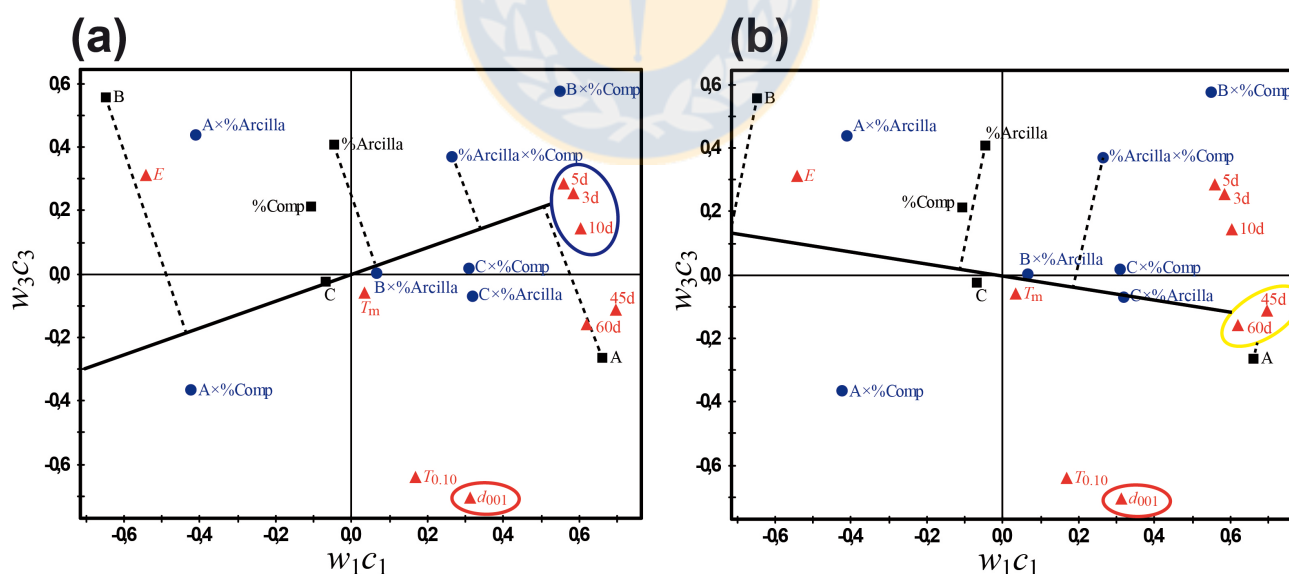


Figura 4.48. Gráficos de *loadings* del primer componente (w_1c_1) vs. *loadings* del tercer componente (w_3c_3) para el modelo obtenido del diseño D-optimal tras 8 PLS-componentes para evaluar pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente. (▲) respuestas, (■) variables e (●) interacciones entre variables. A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer® I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina).

La mayor afinidad del carvacrol con la nanoarcilla A (octadecilamina) se debería a su mayor interacción hidrofóbica con estas cadenas. Pero debe considerarse que con esta nanoarcilla se obtienen los menores índices de exfoliación, lo que se apoya en los coeficientes de regresión de esta nanoarcilla en la respuesta d_{001} (ver gráfico 4.46) y con el gráfico de *loadings* al estar esta variable al lado opuesto en el gráfico con respecto a la respuesta d_{001} . La siguiente nanoarcilla en mejor afinidad con el carvacrol es la Arcilla C (dimetil dialquil (C14–C18) amina) que a diferencia de la nanoarcilla A, ha mostrado los mejores índices de intercalación, por lo que en un balance entre control de liberación de carvacrol y mejores propiedades de empaque, la nanoarcilla C es la elección correcta.

La optimización por el método SIMPLEX ejecutada al modelo PLSR del diseño experimental, arroja que la formulación que optimiza la retención de carvacrol en el film, pero que también optimiza las propiedades de empaque está dada por nanoarcilla C (Nanomer[®] I.44P con modificador dimetil dialquil (C14–C18) amina) = 5,0 %m/m, compatibilizante = 4,5 %m/m. Ésta formulación posee un valor de vida media de pérdida de carvacrol $\theta_{1/2}$ de aproximadamente 15 días a temperatura ambiente.

4.3.5. Estudio de pérdida de carvacrol desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM por volatilización hacia el ambiente

Se estudió las variables que controlan la pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM utilizando los experimentos del diseño D-optimal para el estudio de liberación de carvacrol a simulador de alimento (sección 4.3.3). El diseño detallado de experimentos junto a los resultados experimentales se muestran en la tabla 4.30. Las respuestas a medir en este estudio son de dos tipos: por un lado los parámetros de pérdida de carvacrol desde los films representado por el tiempo requerido para la disminución del 50 % de la concentración de carvacrol inicial en el films $\theta_{1/2}$, y por otro las propiedades morfológicas, térmicas y mecánicas del bionanocompuesto d_{001} , $T_{0,50}$, y E , para evaluar la formulación que tiene el mejor equilibrio entre control de liberación y propiedades de empaque óptimas.

Tabla 4.30. Resultados experimentales para el diseño D–óptimo del estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.

Exp. ^a	Variables			Respuestas			
	x_1 Tipo arcilla ^b	x_2 %Arcilla (%m/m)	x_3 %Plast. ^c (%m/m)	y_1 d_{001} (nm)	y_2 $T_{0,50}$ (° C)	y_3 E (MPa)	y_4 $\theta_{1/2}$ (días)
1	A	3,0 (-1) ^d	30 (-1)	Exfoliado	296,5	274,4	14,32
2	A	3,0 (-1)	30 (-1)	35,87	292,8	258,6	17,31
3	A	6,0 (+1)	30 (-1)	31,76	273,5	496,5	6,03
4	A	3,0 (-1)	40 (+1)	36,82	296,5	49,5	16,32
5	A	6,0 (+1)	40 (+1)	34,11	258,4	68,6	12,35
6	B	3,0 (-1)	30 (-1)	Exfoliado	311,9	322,4	11,29
7	B	6,0 (+1)	30 (-1)	34,67	315,2	385,5	7,23
8	B	3,0 (-1)	40 (+1)	Exfoliado	312,9	87,0	7,59
9	B	6,0 (+1)	40 (+1)	34,96	312,2	93,9	10,63
10	B	6,0 (+1)	40 (+1)	33,29	–	113,1	11,89
11	C	3,0 (-1)	30 (-1)	Exfoliado	311,6	287,9	–
12	C	3,0 (+1)	30 (-1)	Exfoliado	315,1	269,7	16,37
13	C	6,0 (-1)	30 (+1)	Exfoliado	312,4	385,5	–
14	C	3,0 (-1)	40 (+1)	Exfoliado	313,3	72,0	17,80
15	C	6,0 (+1)	40 (+1)	Exfoliado	303,8	80,0	13,08
16	C	4,5 (0)	35 (0)	Exfoliado	310,3	126,8	14,49
17	C	4,5 (0)	35 (0)	Exfoliado	311,0	137,1	12,75
18	C	4,5 (0)	35 (0)	Exfoliado	310,9	155,4	13,49

^a Experimentos en el diseño.

^b A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietyl octadecilamina);

C = Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

^c Proporción de plastificante 25:75 glicerina:agua.

^d Valores codificados para las variables.

Debido al alto número de muestras que mostraron exfoliación y por tanto no aportaban un valor numérico de d_{001} , se procedió a hacer la calibración multivariada solo con los datos cinéticos, térmicos y mecánicos ya que el número de dato faltantes de DRX superaba el 10 % de datos faltantes que resiste un análisis por PLSR.

La tabla 4.31 muestra los parámetros de evaluación del modelo obtenido por PLSR a partir de los resultados experimentales de las tres respuestas medidas, cuyo polinomio es el mostrado en la ecuación (14). Tras seis PLS-componentes, el modelo de regresión postulado posee un $R^2 = 0,970$ y $Q^2 = 0,390$, siendo satisfactorio, y mostrando R^2 individuales para cada respuesta con valores de $R^2 > 0,93$, y $Q^2 > 0,33$ lo que se considera satisfactorio para utilizar el modelo con confianza. La tabla A.8 (ver Anexo A) muestra la ANOVA del modelo estadístico, el cual

muestra que la influencia de las variables en las respuestas son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 4.31. Evaluación del modelo obtenido del diseño experimental D-optimal tras 6 PLS-componentes para el estudio de la pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.

Parámetro del modelo	Respuestas			Total
	$T_{0.50}$	E	$\theta_{1/2}$	
R^2	0,983	0,988	0,935	0,970
Q^2	0,479	0,781	0,327	0,390
Validez del modelo	0,314	0,591	0,701	
Reproducibilidad	0,987	0,983	0,865	
Número de condición				2,2994

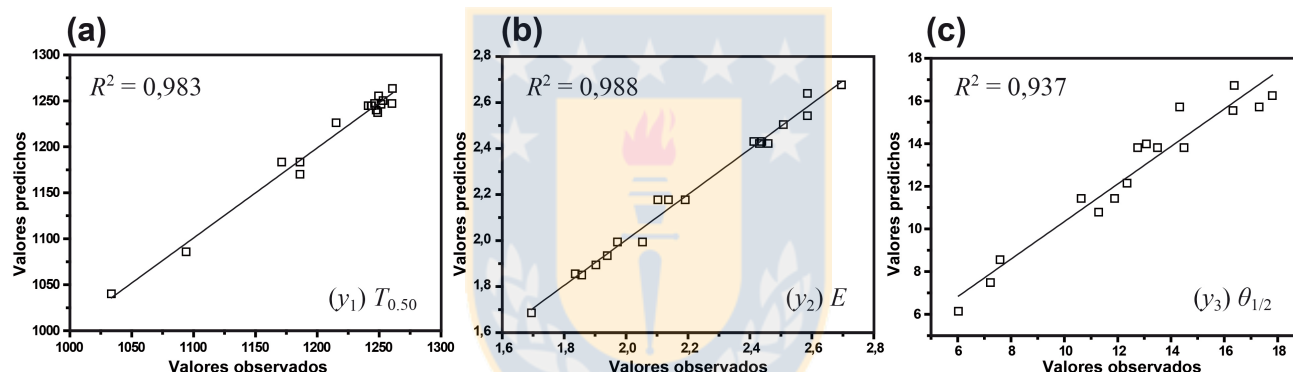


Figura 4.49. Gráficos de valores observados vs. valores predichos por PLSR (tras 6 PLS-componentes) para estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C. (a) y_1 temperatura de descomposición $T_{0.50}$ con transformación lineal $4y$, (b) y_2 módulo de Young E con transformación $\log(y)$, y (c) y_3 tiempo de pérdida $\frac{1}{2}$ de carvacrol en el film $\theta_{1/2}$.

El gráfico de coeficientes (ver figura 4.50) muestra que la retención de carvacrol en los films de ATP/MOM se debe principalmente a la exfoliación del material, siendo la formación de estructuras tortuosas la principal causa del control de su liberación. Esto debido que a pesar de que la Arcilla C (montmorillonita sódica) es altamente lipofílica, el valor de su coeficiente de regresión en el modelo es el que más impacta de manera positiva la respuesta de $\theta_{1/2}$.

Tabla 4.32. Coeficientes de regresión normalizados (*b*) calculados tras 6 PLS-componentes para el estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C.

Término del polinomio	y_1 Temperatura de descomposición $T_{0,50}$	y_2 módulo de Young E	y_3 tiempo de vida media $\theta_{1/2}$
constante b_0	$19,042 \pm 0,045^a$ $p = 0,000$	$7,197 \pm 0,039$ $p = 0,000$	$3,474 \pm 0,085$ $p = 0,000$
b_1 Arcilla A ^b	$-1,039 \pm 0,057$ $p = \mathbf{0,000}$	$-0,090 \pm 0,046$ $p = 0,086$	$0,062 \pm 0,117$ $p = 0,611$
b_1 Arcilla B ^b	$0,500 \pm 0,056$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,162 \pm 0,045$ $p = \mathbf{0,007}$	$-0,526 \pm 0,114$ $p = \mathbf{0,002}$
b_1 Arcilla C ^b	$0,539 \pm 0,055$ $p = \mathbf{0,000}$	$-0,071 \pm 0,044$ $p = 0,142$	$0,464 \pm 0,112$ $p = \mathbf{0,003}$
b_2 %Arcilla	$-0,237 \pm 0,051$ $p = \mathbf{0,002}$	$0,188 \pm 0,041$ $p = \mathbf{0,002}$	$-0,584 \pm 0,104$ $p = \mathbf{0,000}$
b_3 %Plastif.	$-0,116 \pm 0,051$ $p = \mathbf{0,050}$	$-0,999 \pm 0,046$ $p = 0,064$	$0,270 \pm 0,104$ $p = \mathbf{0,031}$
b_{12} Arcilla A×%Arcilla	$-0,447 \pm 0,057$ $p = \mathbf{0,000}$	$0,098 \pm 0,046$ $p = 0,064$	$-0,236 \pm 0,117$ $p = 0,078$
b_{12} Arcilla B×%Arcilla	$0,256 \pm 0,054$ $p = \mathbf{0,001}$	$-0,037 \pm 0,043$ $p = 0,418$	$0,386 \pm 0,111$ $p = \mathbf{0,008}$
b_{12} Arcilla C×%Arcilla	$0,191 \pm 0,060$ $p = \mathbf{0,013}$	$-0,061 \pm 0,048$ $p = 0,238$	$-0,151 \pm 0,123$ $p = 0,254$
b_{13} Arcilla A×%Plastif.	$-0,071 \pm 0,057$ $p = 0,249$	$-0,143 \pm 0,046$ $p = \mathbf{0,014}$	$0,074 \pm 0,117$ $p = 0,542$
b_{13} Arcilla B×%Plastif.	$0,042 \pm 0,054$ $p = 0,460$	$0,069 \pm 0,043$ $p = 0,150$	$-0,129 \pm 0,111$ $p = 0,277$
b_{13} Arcilla C×%Plastif.	$0,029 \pm 0,060$ $p = 0,641$	$0,074 \pm 0,048$ $p = 0,161$	$0,055 \pm 0,123$ $p = 0,667$
b_{23} %Arcilla×%Plastif.	$-0,112 \pm 0,047$ $p = \mathbf{0,044}$	$-0,055 \pm 0,037$ $p = 0,184$	$0,383 \pm 0,096$ $p = \mathbf{0,004}$

^a Coeficiente de regresión normalizado ± error estándar, incluido el valor de *p*.

^b A = Nanomer® I.30E (octadecilamina); B = Nanomer® I.34TCN (metil dihidroxietyl octadecilamina); C = Nanomer® montmorillonita sódica hidrofílica.

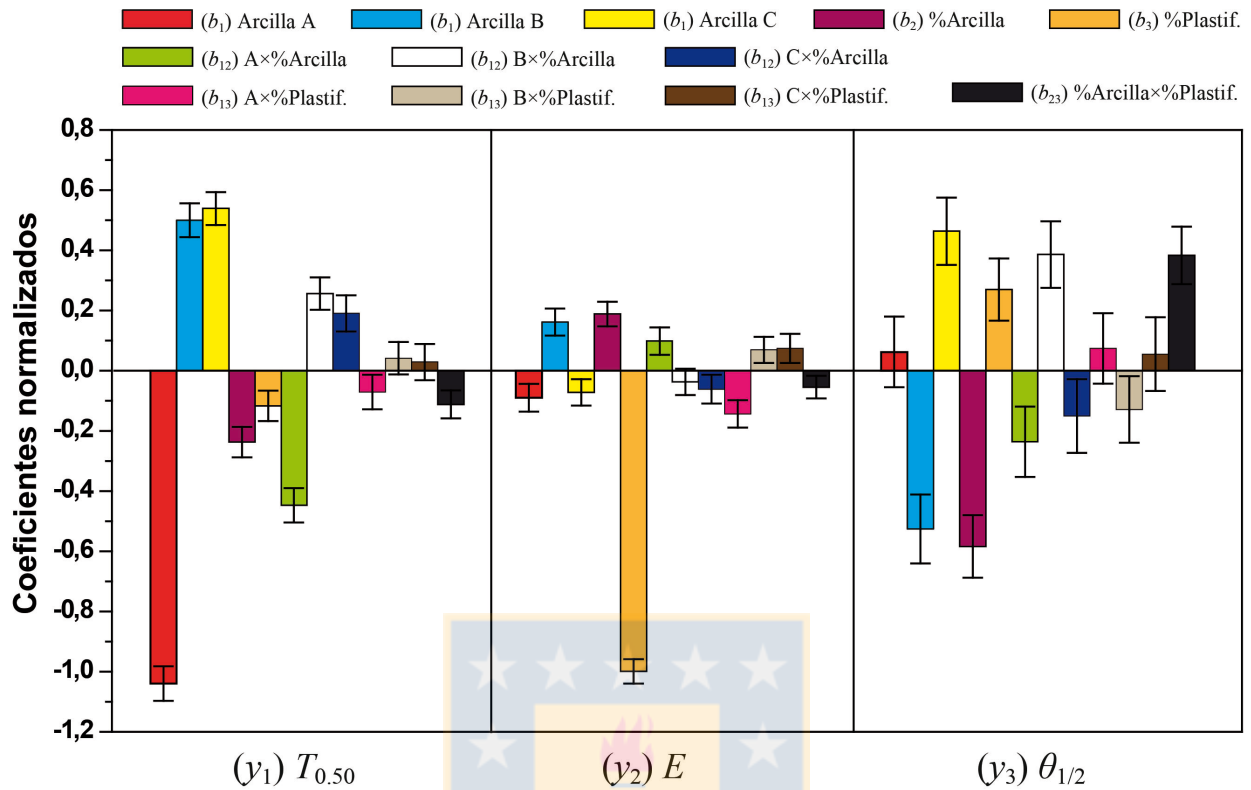


Figura 4.50. Gráfico de coeficientes de regresión normalizados (b) obtenidos por PLSR (tras 6 PLS-componentes) para las variables individuales e interacciones entre variables para cada respuesta del diseño experimental D-optimal para el estudio de pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C. Arcilla A = Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); B = Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); C = Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

La figura 4.51a muestra los x -scores del primer y segundo PLS-componente. Al analizar este gráfico se deduce que los $scores$ del primer componente (t_1) divide principalmente los experimentos de acuerdo a las propiedades térmicas ($T_{0.50}$) en donde esta respuesta aumenta a lo largo de este eje t_1 . Los experimentos encerrados en amarillo poseen los valores más altos de $T_{0.50}$. Los x -scores del segundo componente (t_2) divide los experimentos principalmente de acuerdo a las propiedades mecánicas (E) en donde el módulo de Young aumenta al bajar el eje t_2 . Las muestras encerradas en rojo poseen los mayores valores de E . Debido a esto los experimentos que se encuentren ubicados en el cuadrante inferior derecho del gráfico de $scores$, justo en la intersección de ambas elipses, son los experimentos que mejor combinan las propiedades mecánicas y térmicas óptimas.

Para compatibilizar estas propiedades de empaque de los bionanocompuestos con las propiedades de retención de carvacrol se debe inspeccionar el siguiente PLS-componente. La información de este componente se muestra en el gráfico 4.51b que incluye los *x-scores* del tercer componente (t_3) y al graficarlo vs. t_1 , se deduce que contienen la información concerniente a la liberación de carvacrol, ya este eje t_3 divide los experimentos principalmente por $\theta_{1/2}$, en donde la retención aumenta (o sea, disminuye la liberación de carvacrol desde el film) hacia el lado positivo de este eje. Así en el gráfico 4.51b las formulaciones encerradas en rojo poseen los valores más bajos de $\theta_{1/2}$, y por tanto poseen liberación de carvacrol más rápida. Las formulaciones que se encuentran en la zona superior al cero de este eje t_3 poseen los valores de $\theta_{1/2}$ más altos. Las formulaciones encerradas en amarillo poseen los mayores niveles de $\theta_{1/2}$, pero para equilibrar esta retención de carvacrol con las propiedades de empaque (mecánicas y térmicas) se consideran las formulaciones óptimas las encerradas en azul (experimentos N° 11 y 12), ya que además del alto valor de $\theta_{1/2}$, poseen también buenas propiedades mecánicas y térmicas.

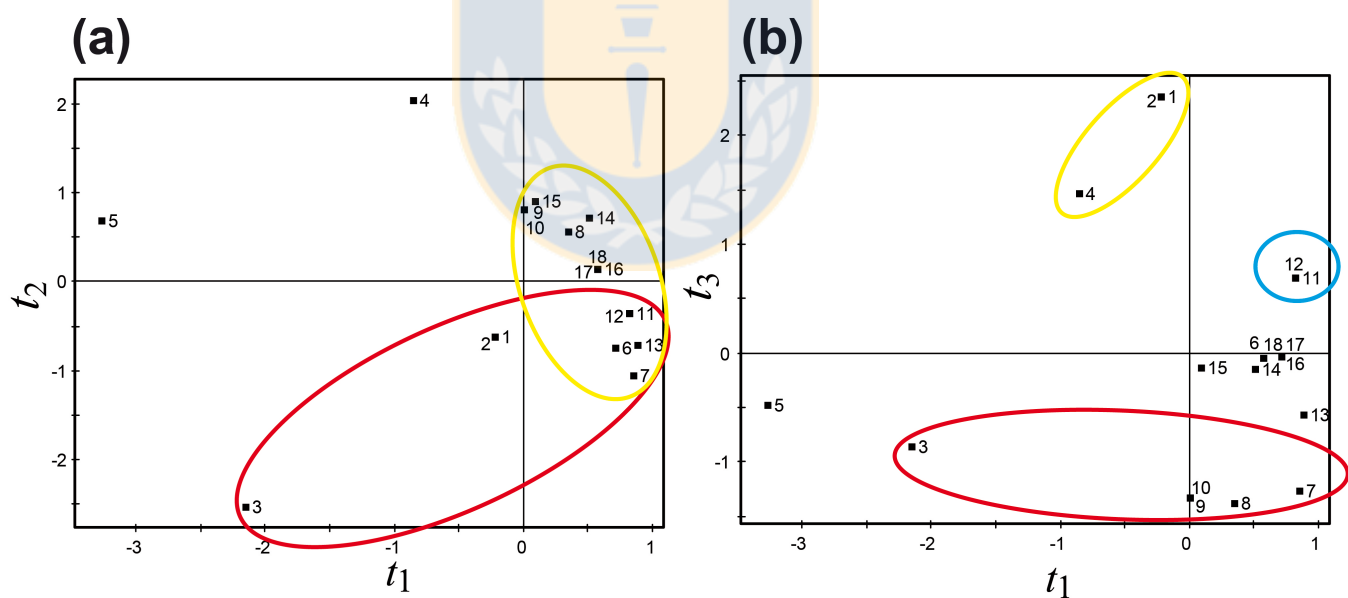


Figura 4.51. Gráficos de *x-scores* obtenidos por PLSR (tras 6 PLS-componentes) para el diseño D-optimal del estudio de pérdida de carvacrol por volatilización desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM a 18 °C, (a) gráfico t_1 vs. t_2 , (b) gráfico t_1 vs. t_3 . Cada punto en los gráficos es un experimento del diseño.

De acuerdo al equilibrio entre las propiedades de empaque estudiadas para las formulaciones de bionanocompuestos de ATP/MOM, al aplicar la optimización por método SIMPLEX el resultado es similar al deducido a través de los gráficos de *scores* y coeficientes: Tipo de arcilla = Nanomer[®] montmorillonita sódica, %Arcilla = 3,16 %m/m, %Plastif. = 30,0 %m/m, Glicerina/Agua = 25/75, $T_{\text{mix}} = 110$ °C, y $v_{\text{mix}} = 50$ rpm, la cual resulta en una vida media de pérdida de carvacrol $\theta_{1/2}$ de aproximadamente 16 días a temperatura ambiente.

4.4. Efecto de la temperatura en la liberación de carvacrol desde nano/bionanocompuestos

El efecto de la temperatura en la liberación de carvacrol desde films de nano/bionanocompuestos se determinó mediante la ecuación de Arrhenius (ecuación (18)) a partir de los valores de los coeficientes de difusión D para las diferentes temperaturas de experimentación

$$D = D_0 \exp(-E_a/RT) \quad (18)$$

donde R es la constante de los gases ideales y D_0 es el factor pre-exponencial el cual se obtiene del intercepto en el eje y del gráfico $\ln D$ vs $1/T$, siendo T la temperatura de experimentación, y desde cuya pendiente se obtiene E_a que es la energía de activación de difusión. Esta energía de activación de difusión representa la sensibilidad del coeficiente de difusión a la temperatura [129, 130].

Al evaluar el efecto de la temperatura en la liberación de carvacrol desde films de nano/bionanocompuestos se observa en la tabla 4.33 que tanto para liberación por difusión en el simulador de alimento como liberación por volatilización hacia el ambiente, el coeficiente de difusión D disminuye con la temperatura, lo que se presenta independiente de la nanoarcilla utilizada. Con la disminución de la temperatura se observa que el equilibrio en la liberación de carvacrol (C_∞) se produce casi a la mitad del tiempo (ver figura 4.52) tanto para PEBD/MOM como para ATP/MOM, lo que indica que estos materiales a temperatura de refrigeración y congelación pueden retener en promedio más del 60 – 70 % del carvacrol cargado al cabo de 2 meses de almacenamiento, lo que permite un “tiempo de guarda” para este material antes de ser

usado. Se puede apreciar que los valores de $\theta_{1/2}$ en refrigeración y congelación para nanocompuestos PEBD/MOM pueden aumentar hasta 10 veces en promedio. Para bionanocompuestos de ATP/MOM puede aumentar solo hasta 4 veces en promedio, debido a la poca afinidad del carvacrol con esta matriz hidrofílica, a diferencia de la alta afinidad que tiene con la matriz orgánica de PEBD.

Tabla 4.33. Coeficientes de difusión D y energías de activación de difusión E_a para la liberación de carvacrol desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con %Arcilla = 3,0 %m/m; %Compat. = 7,0 %m/m, y desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM con %Arcilla = 3,0 %m/m; %Plastif. = 30 %m/m.

Tipo de nanoarcilla ^a	PEBD/MOM					ATP/MOM		
	Simulador de alimento		Volatilización hacia el ambiente			Volatilización hacia el ambiente		
	$D \times 10^{-14}$ (m ² s ⁻¹)	E_a (kJ mol ⁻¹)	$D \times 10^{-14}$ (m ² s ⁻¹)	$\theta_{1/2}$ (días)	E_a (kJ mol ⁻¹)	$D \times 10^{-14}$ (m ² s ⁻¹)	$\theta_{1/2}$ (días)	E_a (kJ mol ⁻¹)
Nanomer [®] I.30E								
18 °C	8,87	7,11	2,40	48,8	8,88	30,29	14,3	4,39
4 °C	7,64		1,82	152,7		25,12	29,4	
-18 °C	–		1,41	427,9		23,07	37,1	
Nanomer [®] I.34TCN								
18 °C	11,37	10,66	4,12	34,1	14,55	33,73	11,3	19,38
4 °C	9,10		2,31	147,2		23,41	33,3	
-18 °C	–		1,68	428,4		10,98	47,7	
Nanomer [®] I.44P								
18 °C	11,44	17,23	2,80	42,3	10,11			
4 °C	7,99		2,06	179,1				
-18 °C	–		1,53	324,8				
Nanomer [®] montmorillonita								
18 °C						20,45	16,4	5,23
4 °C						19,83	78,3	
-18 °C						15,28	41,7	

^a Nanomer[®] I.30E (octadecilamina); Nanomer[®] I.34TCN (metil dihidroxietil octadecilamina); Nanomer[®] I.44P (dimetil dialquil (C14–C18) amina); Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

El efecto de la temperatura en el coeficiente de difusión D de acuerdo a la relación de Arrhenius para las formulaciones de nano/bionanocompuestos de PEBD/MOM y ATP/MOM con tres tipos de nanoarcilla se grafican en la figura 4.53. Los gráficos $\ln D$ vs. $1/T$ resultan lineales y de ellos se calculan las energías de activación de difusión E_a las cuales se presentan en la tabla 4.33. La linealidad de estos gráficos puede verse afectada por el hecho de que a menor temperatura la difusión se hace más lenta y por tanto demora más en llegarse a la C_∞ definitiva de equilibrio.

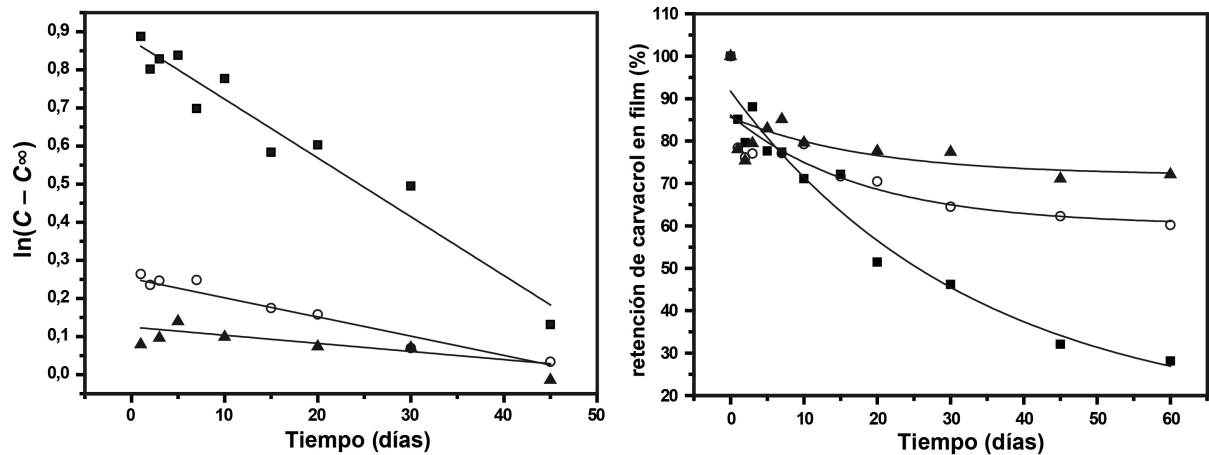


Figura 4.52. (a) Gráfico $\ln(C - C_\infty)$ vs. tiempo, y (b) retención vs. tiempo para la pérdida de carvacrol hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con 3 %m/m Nanomer[®] I.44P y 7 %m/m Compatibilizante a: (■) temperatura ambiente de 18 °C, (○) refrigeración a 4 °C, y (▲) congelación a -18 °C.

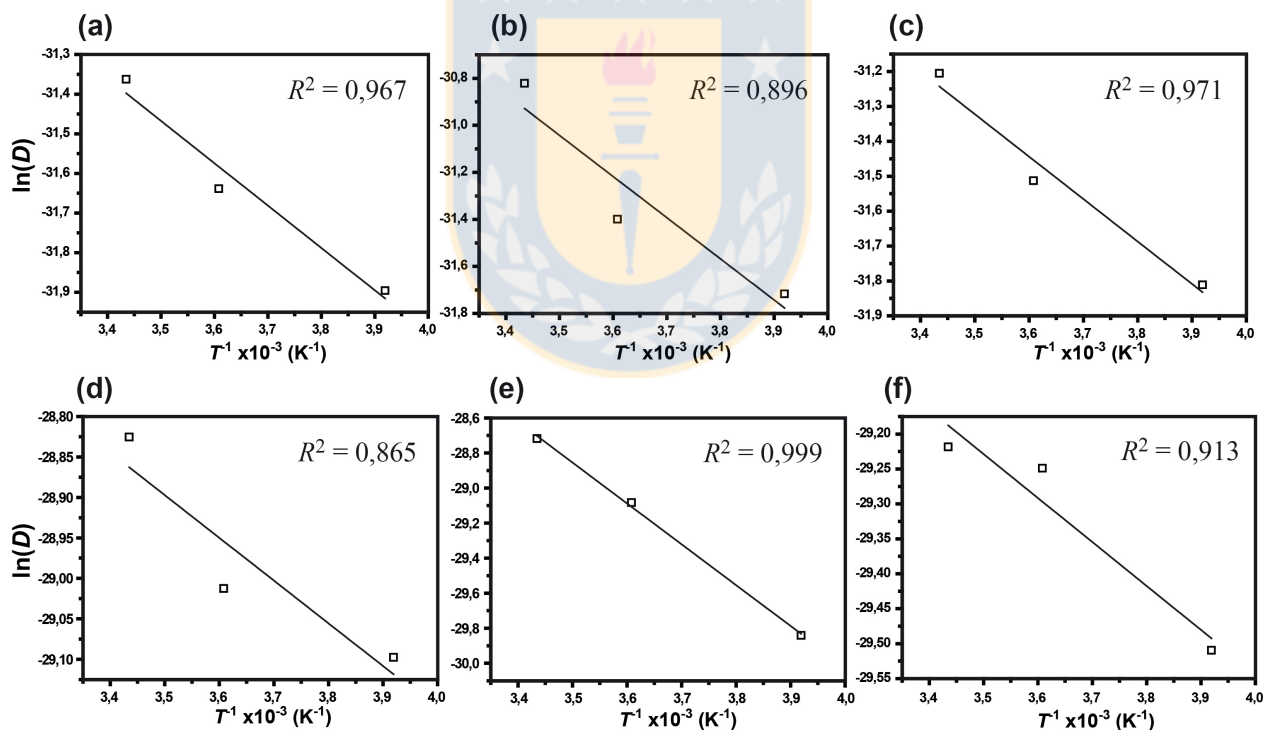
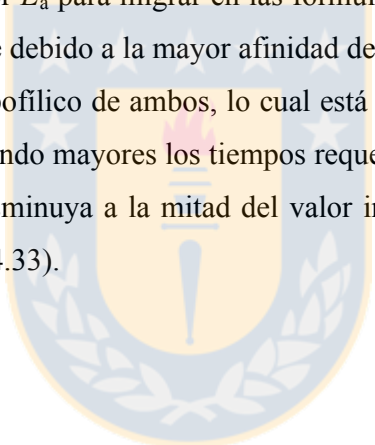


Figura 4.53. Gráfico de Arrhenius $\ln D$ vs $1/T$ para la pérdida de carvacrol hacia el ambiente desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM con 4 %m/m de compatibilizante: (a) 5 %m/m Nanomer I.30E (b) 5 %m/m Nanomer I.34TCN (c) 5 %m/m Nanomer I.44P; y desde films de bionanocompuestos de ATP/MOM con 30 %m/m de plastificante: (d) 3 %m/m Nanomer[®] I.30E (e) 3 %m/m Nanomer[®] I.34TCN (f) 3 %m/m Nanomer[®] montmorillonita sódica hidrofílica.

La energía de activación de difusión se define como la energía requerida por una molécula migrante para moverse entre las cadenas de una matriz polimérica. Cuando el migrante obtiene suficiente energía, puede moverse al espacio adyacente dejando el espacio para que la siguiente molécula lo ocupe formándose así el flujo de difusión, y esta energía es proporcionada por la temperatura y tiene efecto en el migrante, en la matriz polimérica y en el medio de contacto del migrante [131].

Analizando la tabla 4.33 se observa que la mayor cantidad de energía de activación requerida para la migración de carvacrol en PEBD/MOM en contacto con el simulador de alimentos, se da con la nanoarcilla Nanomer[®] I.44P, probablemente debido a los mayores niveles de intercalación que se obtienen al utilizar esta nanoarcilla en la formulación.

Para el caso de la migración de carvacrol hacia el ambiente por pérdida debido a volatilización, en promedio se requiere mayor E_a para migrar en las formulaciones de PEBD/MOM que en las de ATP/MOM, probablemente debido a la mayor afinidad del carvacrol con la matriz polimérica orgánica debido al carácter lipofílico de ambos, lo cual está en concordancia con los valores de $\theta_{1/2}$ para ambos materiales, siendo mayores los tiempos requeridos para que la concentración del principio activo en el film disminuya a la mitad del valor inicial en los films de PEBD/MOM que en ATP/MOM (ver tabla 4.33).



4.5. Estudio *in vivo* del efecto antifúngico en frutillas (*Fragaria* × *ananassa*) de films de nano/bionanocompuestos cargados con principios activos de aceites esenciales

Una vez optimizadas las formulaciones de los nano/bionanocompuestos y sus condiciones de proceso de síntesis con las que se obtienen los films con las propiedades de empaque y de liberación de droga deseadas, se procedió a evaluar las concentraciones de carga de principios activos de aceites esenciales que producen la inhibición *in vivo* de las especies de hongos *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* inoculados en frutillas frescas. Como primer apronte se procedió a cargar los nano/bionanocompuestos con carvacrol y se evaluó la concentración en film, necesaria para alcanzar la CI_{50} para frutillas inoculadas con conidias de *Botrytis cinerea in vivo* aplicando los films por contacto indirecto.

4.5.1. Efecto antifúngico in vivo de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol sobre frutillas inoculadas con Botrytis cinerea por contacto indirecto con los films.

La figura 4.54 muestra las curvas de inhibición de crecimiento de *Botrytis cinerea* en frutillas tras cinco días de almacenamiento en contacto indirecto con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol en distintas concentraciones a temperatura ambiente. Se aprecia que la inhibición de crecimiento microbiano sigue un comportamiento que se ajusta a una curva de tipo sigmoideal que se da de manera clásica en la inhibición de crecimientos de microorganismos bajo concentraciones crecientes de droga. Las concentraciones usadas de carvacrol en las formulaciones van de 0 a 47,58 mg g⁻¹ para films de PEBD/MOM, y de 0 a 61,31 mg g⁻¹ para films de ATP/MOM, y se detallan en la tabla 4.34 donde además se muestran los valores de porcentaje de área lesionada en frutillas.

El proceso de síntesis de films de PEBD/MOM por mezclado en estado fundido en los parámetros de proceso fijados, produce una pérdida de principio activo por volatilización durante el proceso de entre 30 – 40 % aproximadamente. Para el proceso de síntesis de films de ATP/MOM por método de extrusión con los parámetros de proceso fijados, produce una pérdida de entre 70 – 85 % de principio activo aproximadamente. La razón por la cual se pierde más principio activo en la extrusión que en el mezclado por estado fundido, es que a pesar de que la temperatura es menor, el tiempo de permanencia a esta temperatura es el doble.

Tabla 4.34. Ensayo *in vivo* de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* inoculadas en frutillas por efecto de carvacrol cargado en nano/bionanocompuestos tras cinco días de tratamiento.

Nanocompuestos de PEBD/MOM ^a		Bionanocompuestos de ATP/MOM ^b	
Concentración de carvacrol en film (mg g ⁻¹)	Área de lesión (%)	Concentración de carvacrol en film (mg g ⁻¹)	Área de lesión (%)
Control ^c	41,0 ± 11,5 (10) ^d	Control ^c	41,0 ± 11,5 (10) ^b
3,90	27,2 ± 10,0 (10)	0,99	20,1 ± 6,9 (10)
9,20	29,2 ± 8,2 (10)	1,52	24,6 ± 9,5 (10)
13,55	25,1 ± 11,9 (10)	3,00	31,5 ± 12,3 (10)
26,92	8,3 ± 5,2 (10)	19,57	1,9 ± 1,8 (10)
47,58	10,0 ± 5,2 (10)	61,31	1,0 ± 1,0 (10)

^a Film de 70 mm de diámetro, 1,35 ± 0,04 mm de espesor, con formulación optimizada de nanocompuesto.

^b Film de 70 mm de diámetro, 1,95 ± 0,26 mm de espesor, con formulación optimizada de nanocompuesto.

^c Frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* sin tratamiento con nano/bionanocompuesto.

^d % promedio del área lesionada en frutillas ± error estándar (*n*).

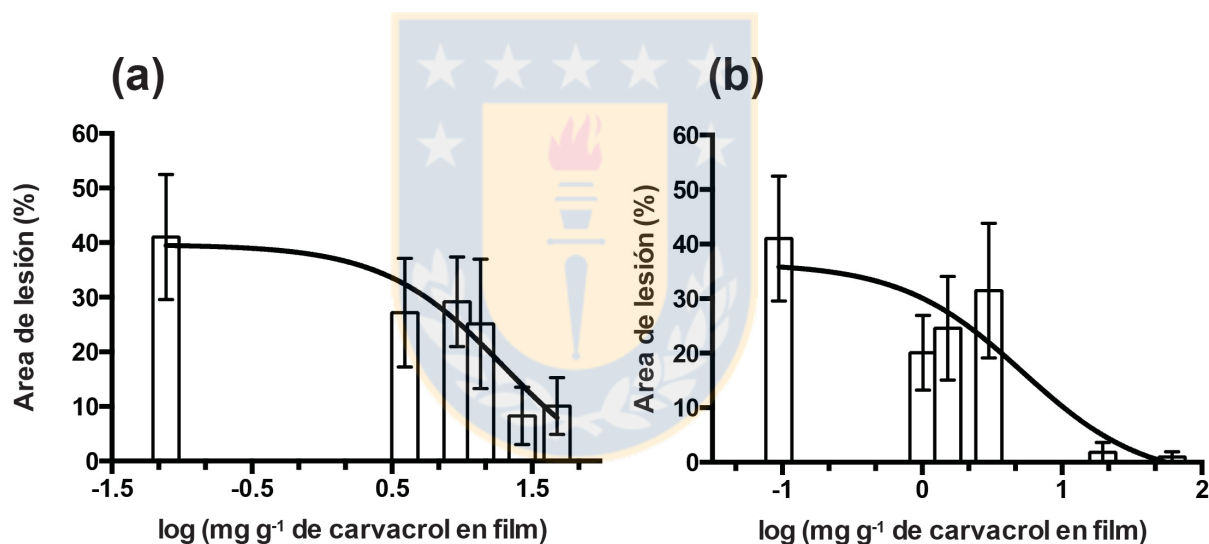


Figura 4.54. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos con diferentes concentraciones de carvacrol sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* tras cinco días de tratamiento (*n* = 10 frutillas por cada nivel de concentración). (a) nanocompuestos de PEBD/MOM con carvacrol, (b) bionanocompuestos de ATP/MOM con carvacrol.

De los datos de porcentaje de área de frutilla lesionada para cada concentración de carvacrol obtenidos, se pudo calcular las CI_{50} para cada tipo de film, resultados que se detallan en la tabla 4.35. Para los films de PEBD/MOM se encontró que la CI_{50} fue de 40,45 mg g⁻¹, y para los films de ATP/MOM fue de 14,16 mg g⁻¹ de carvacrol en film. La diferencia entre los valores de CI_{50} para cada tipo de film está dado porque los films de ATP/MOM son de mayor espesor y por tanto se aplica mayor cantidad de film a cada tratamientos. Llevadas estas concentraciones a

cantidad de carvacrol efectivamente puesta dentro de cada envase en el film aplicado los valores CI_{50} son de 0,452 y 0,346 mg cc^{-1} de carvacrol para PEBD/MOM y ATP/MOM respectivamente, considerando que la masa de cada film puesto dentro de cada envase es de 3,8 y 8,3 g para PEBD/MOM y ATP/MOM respectivamente.

Tabla 4.35. Determinación de CI_{50} de carvacrol sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea*.

	<i>n</i>	log CI_{50}	Intervalo de confianza 95 % de CI_{50}	CI_{50} (mg g^{-1})
PEBD/MOM	50	1,607 ± 1,571	-1,557 a 4,771	40,45
ATP/MOM	50	1,151 ± 0,897	-0,655 a 2,958	14,16

4.5.2. Análisis sensorial de frutillas: prueba de medición del grado de satisfacción con escala hedónica verbal

Para evaluar los eventuales cambios organolépticos producidos en frutillas tratadas con los nano/bionanocompuestos a las CI_{50} calculadas para carvacrol sobre *Botrytis cinerea* en la sección 4.5.1, se realizó una prueba sensorial de tipo afectiva. Para esta prueba se contó con un total de 79 jueces no-entrenados (40 jueces para prueba con PEBD/MOM, y 39 jueces para prueba con ATP/MOM). Los jueces fueron escogidos al azar en la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, siendo 23 hombres y 56 mujeres, de entre 20 y 24 años de edad, todos estudiantes de las carreras de Nutrición y Dietética, Química y Farmacia, y Bioquímica. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 4.36 en donde se concluye que las muestras de frutilla control y las tratadas con nano/bionanocompuestos son significativamente diferentes ($p < 0,0001$), indicando esto que los jueces prefieren de manera significativa la frutilla control por sobre la frutilla tratada con nano/bionanocompuestos.

Tabla 4.36. Resultados análisis sensorial de aceptación en frutillas tratadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol por contacto indirecto.

	Nanocompuestos de PEBD/MOM con carvacrol ^a	Bionanocompuestos de ATP/MOM con carvacrol ^b
Valor de <i>p</i>	< 0,0001	< 0,0001
¿Diferencia significativa?	Sí	Sí
Valor de <i>t</i> / grados de libertad	4,824/78	6,866/76
Grado de satisfacción control ^c	1,500 ± 0,847 (<i>n</i> = 40) ^d	1,615 ± 0,935 (<i>n</i> = 39) ^d
Grado de satisfacción tratamiento ^c	0,225 ± 1,441 (<i>n</i> = 40)	-0,487 ± 1,668 (<i>n</i> = 39)
Diferencia entre medias	1,275 ± 1,670	2,103 ± 1,912
Intervalo de confianza 95 %	0,748 a 1,802	1,492 a 2,713

^a Film de 70 mm de diámetro, 1,35 ± 0,04 mm de espesor y de concentración *ca.* 40 mg g⁻¹ de carvacrol.

^b Film de 70 mm de diámetro, 1,95 ± 0,26 mm de espesor y de concentración *ca.* 15 mg g⁻¹ de carvacrol.

^c Grado de satisfacción manifestado por los jueces al evaluar las muestras de frutillas: -3 = me desagrada muchísimo; -2 = me desagrada mucho; -1 = me desagrada; 0 = ni me gusta ni me desagrada; +1 = me gusta; +2 = me gusta mucho; +3 = me gusta muchísimo.

^d *n* = número de pruebas realizadas.

En las figuras 4.55 y 4.56 se muestra de manera gráfica los resultados de estas pruebas sensoriales. En estos gráficos cada círculo es una calificación puesta a una frutilla probada por un juez mediante una escala hedónica. Se aprecia claramente que los promedios de las clasificaciones son significativamente diferentes y que para las muestras tratadas con nano/bionanocompuestos las calificaciones fluctúan entre los términos “ni me gusta ni me desagrada” y “me desagrada”.

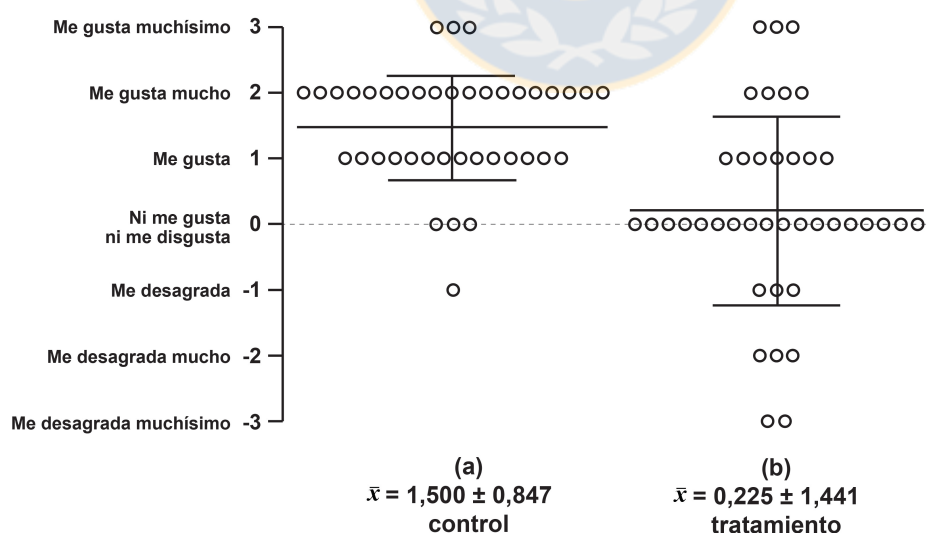


Figura 4.55. Resultados análisis sensorial de grado de satisfacción de frutillas: calificación promedio ± desviación estándar de (a) frutillas control sin tratamiento, (b) frutillas tratadas con nanocompuestos de PEBD/MOM/carcacrol 40 mg g⁻¹ por 2 días (*n* = 40). Cada círculo en el gráfico es la calificación de un juez.

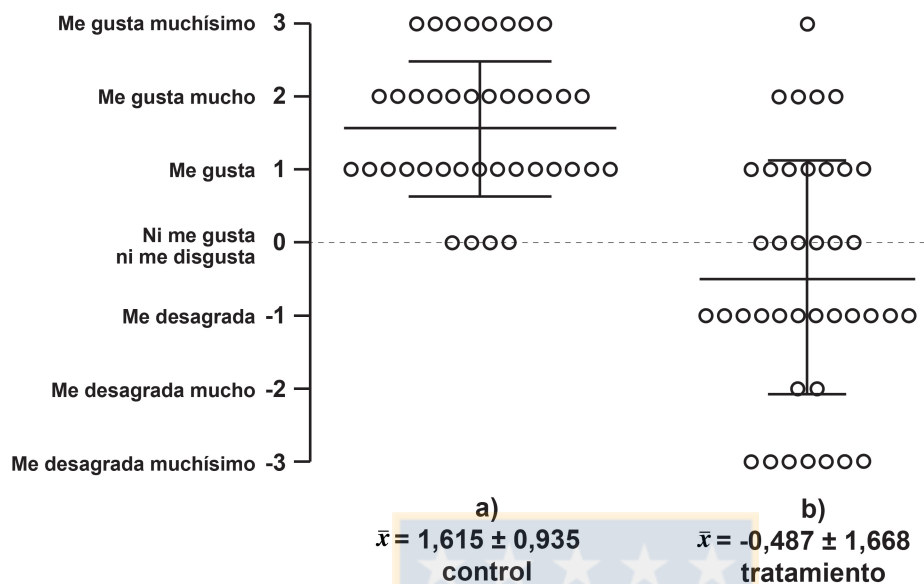


Figura 4.56. Resultados análisis sensorial de grado de satisfacción de frutillas: calificación promedio \pm desviación estándar de (a) frutillas control sin tratamiento, (b) frutillas tratadas con bionanocompuestos de ATP/MOM/carvacrol 15 mg g⁻¹ por 2 días a temperatura ambiente ($n = 39$). Cada círculo en el gráfico es la calificación de un juez.

Dentro de los principales comentarios que reportaron los jueces con respecto a la degustación de frutillas tratadas con films de PEBD/MOM fue olor a orégano o “extraño” (28,9 %), poco olor y poco sabor (22,2 %), y sabor ácido (20,0 %). Para las frutillas tratadas con films de ATP/MOM los comentarios mayoritarios fueron con respecto a sabor a orégano o “extraño” (50,0 %), olor a orégano o “extraño” (26,1 %), y sabor ácido (8,7 %).

4.5.3. Efecto antifúngico in vivo de nano/bionanocompuestos cargados con mezcla carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* por contacto indirecto con los films.

Tras los resultados obtenidos en las pruebas sensoriales de aceptación se concluye que a pesar de la efectividad de los films cargados con la CI₅₀ de carvacrol sobre *Botrytis cinerea*, las frutillas tratadas con estos films sufren alteraciones organolépticas lo suficientemente notorias como para que jueces no-entrenados las puedan detectar, las que incluyen en su mayoría “olor y

sabor a orégano”, lo cual es debido a que el carvacrol es un componente del aceite esencial extraído del orégano entre otras plantas aromáticas.

Para lograr generar la misma efectividad inhibitoria y sin notoria alteración organoléptica se tomó como estrategia generar films de nano/bionanocompuestos con mezcla de principios activos de aceites esenciales, incorporando timol como segunda droga a la formulación. La evidencia acerca del efecto sinérgico/aditivo *in vitro* e *in vivo* producido con mezclas de derivados de aceites esenciales – incluidos carvacrol y timol – sobre diversos microorganismos [46–48] permitiría disminuir la carga de droga en los films necesarias para lograr inhibir el crecimiento de *Botrytis* en las frutillas. Para esto se sintetizaron films de nano/bionanocompuestos con una mezcla de carvacrol/timol 50:50 y se realizó la prueba de búsqueda de la CI_{50} para *Botrytis*. Las concentraciones de la mezcla carvacrol y timol en los films se determinaron por HPLC. La separación cromatográfica de ambos compuestos en mezcla se muestra en la figura 4.57.

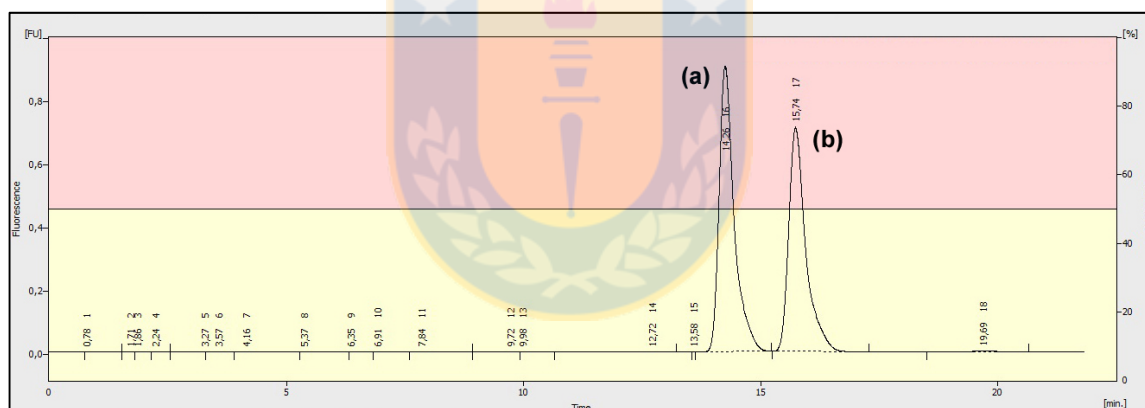


Figura 4.57. Separación cromatográfica por HPLC de (a) carvacrol con $t_R = 14,26$ min, y (b) timol con $t_R = 15,74$ min, presentes en extractos de hexano de muestras de film de nano/bionanocompuestos.

Las concentraciones de mezcla carvacrol/timol cargadas en films fueron de 0 a $20,09 \text{ mg g}^{-1}$ para films de PEBD/MOM, y de 0 a $15,34 \text{ mg g}^{-1}$ para films de ATP/MOM, esto como concentración de droga total (carvacrol + timol) en la formulación. Estas concentraciones son la suma total de ambos principios activos presentes en una proporción de 50:50. Los detalles de la curva de concentraciones se muestran en la tabla 4.37 donde además se reportan los valores de % de área lesionada en frutillas. La figura 4.59 muestra un ejemplo de este experimento con *Botrytis cinerea*, y figura 4.64a muestra la microfotografía de una lesión.

En la figura 4.58 se pueden apreciar las curvas de inhibición de crecimiento de *Botrytis* para ambos tipos de film en frutillas inoculadas. Se aprecian comportamientos sigmoidales clásicos en las curvas, en donde las CI_{50} calculadas para ambos tipos de films son de 13,23 y 5,90 $mg\ g^{-1}$ para PEBD/MOM y ATP/MOM respectivamente (ver tabla 4.38). Comparando los resultados de los films cargados solo con carvacrol, se puede apreciar que las concentraciones necesarias para lograr las CI_{50} han bajado en cerca de un 60 % para PEBD/MOM y en un 50 % para ATP/MOM producto de la sinergia aditiva de estos compuestos sobre *Botrytis*.

Tabla 4.37. Ensayo *in vivo* de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* inoculadas en frutillas por acción en fase vapor de carvacrol/timol (50:50) cargado en nano/bionanocompuestos tras cinco días de tratamiento.

PEBD/MOM ^a		ATP/MOM ^b	
Concentración total de carvacrol/timol en film ($mg\ g^{-1}$) ^c	Área de lesión (%)	Concentración total de carvacrol/timol en film ($mg\ g^{-1}$) ^c	Área de lesión (%)
Control ^d	57,6 ± 10,5 (9) ^e	Control ^d	57,6 ± 10,5 (9) ^e
6,44 ^c	49,2 ± 9,3 (9)	0,64	26,4 ± 8,2 (9)
9,77	32,8 ± 9,5 (9)	1,13	21,9 ± 10,8 (9)
13,29	22,8 ± 7,9 (9)	2,31	33,9 ± 5,5 (9)
15,99	24,5 ± 12,2 (9)	3,42	24,5 ± 10,0 (9)
19,52	12,9 ± 5,7 (9)	7,46	5,8 ± 3,3 (9)
20,09	0,0 ± 0,0 (9)	15,34	0,0 ± 0,0 (9)

^a Film de 70 mm de diámetro, 1,35 ± 0,04 mm de espesor, con formulación optimizada de nanocompuesto.

^b Film de 70 mm de diámetro, 1,95 ± 0,26 mm de espesor, con formulación optimizada de nanocompuesto.

^c Expresado como $mg\ g^{-1}$ totales de compuesto activo: 50 % carvacrol y 50 % timol.

^d Frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* sin tratamiento con nano/bionanocompuesto.

^e % promedio del área lesionada en frutillas ± error estándar (*n*).

Tabla 4.38. Determinación de CI_{50} total de carvacrol/timol (50:50) en films de nano/bionanocompuestos para la inhibición de *Botrytis cinerea* inoculadas en frutillas.

	<i>n</i>	log CI_{50}	Intervalo de confianza 95 % de CI_{50}	CI_{50} ($mg\ g^{-1}$)
PEBD/MOM	54	1,122 ± 0,973	-0,836 a 3,079	13,23
ATP/MOM	54	0,771 ± 0,211	0,346 a 1,196	5,90

Teniendo las CI_{50} sobre *Botrytis cinerea* en frutillas para las nuevas formulaciones de films de nano/bionanocompuestos cargados con mezcla de carvacrol/timol (50:50) se evaluó nuevamente si disminuyendo las concentraciones en un 50 – 60 % se producen cambios notorios en las propiedades organolépticas en frutillas. Para esto se realizó un nuevo ensayo sensorial, el cual

será de tipo discriminativo. La prueba específica realizada fue una prueba discriminativa de tipo triangular, la cual tiene por objetivo evaluar si un panel de jueces semi-entrenados son capaces de detectar cuales son las frutillas que han sido tratadas con nano/bionanocompuestos. Esta prueba posee una probabilidad de un 33,3 % de acertar por azar, lo que la torna en una prueba sensorial más estricta al momento de evaluar cambios en las características organolépticas.

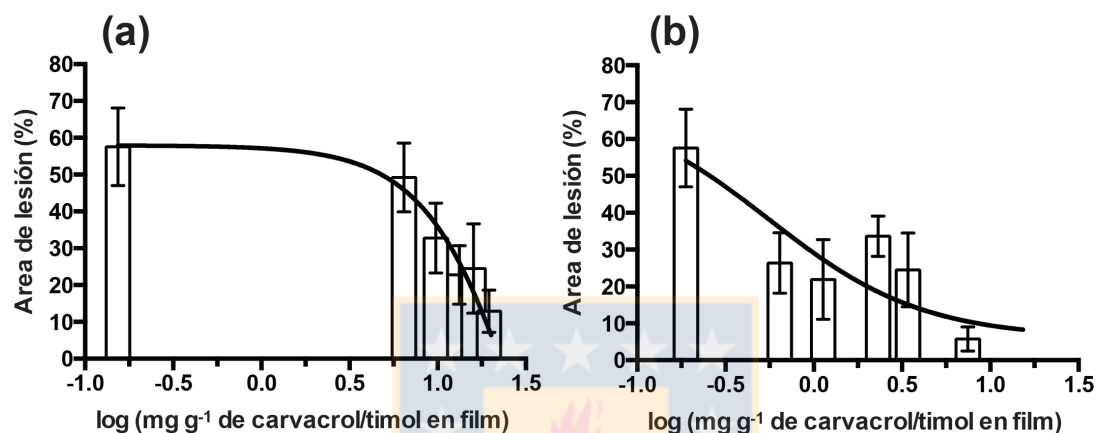


Figura 4.58. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos con diferentes concentraciones totales de carvacrol/timol (50:50) sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* tras cinco días de tratamiento ($n = 9$ por cada nivel de concentración) (a) nanocompuesto de PEBD/MOM con carvacrol/timol (50:50), (b) bionanocompuesto de ATP/MOM con carvacrol/timol (50:50).

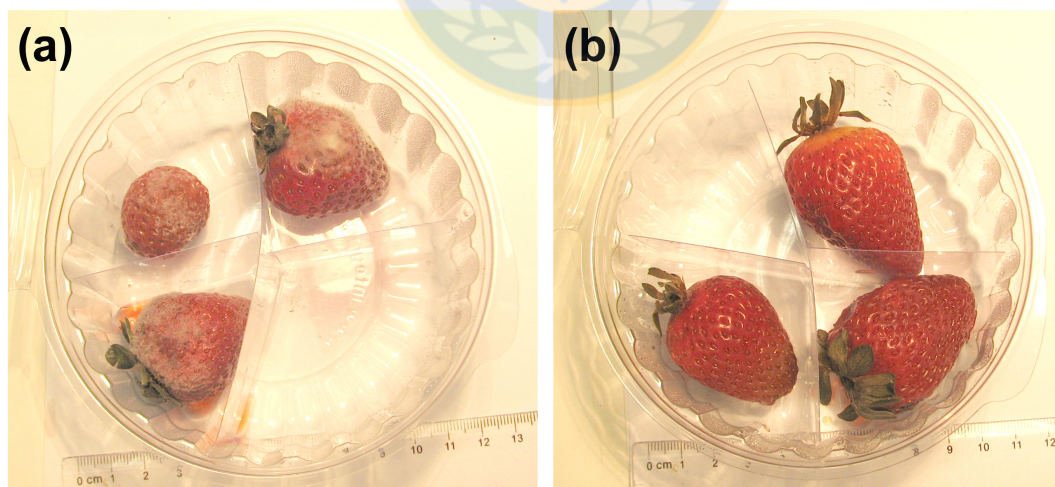


Figura 4.59. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* empacadas por cinco días, (a) control de frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea*, (b) frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* y empacadas en contacto indirecto con films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con 20,09 mg g⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50).

4.5.4. Análisis sensorial de frutillas: prueba discriminativa triangular

Para esta prueba discriminativa se empaquetaron frutillas por dos días en envases con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol (50:50) en concentraciones totales de 13,0 y 6,0 mg g⁻¹ para films de PEBD/MOM y ATP/MOM respectivamente a temperatura ambiente. En esta prueba se contó con un total de 52 jueces semi-entrenados (26 jueces para pruebas con PEBD/MOM, y 26 jueces para pruebas con ATP/MOM). Los jueces fueron seleccionados e instruidos por un total de 5 horas teóricas, siendo todos los jueces estudiantes de 3er semestre de la carrera de Nutrición y Dietética de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, y conformados de 3 hombres y 49 mujeres, de entre 20 y 22 años de edad.

Tabla 4.39. Resultados análisis sensorial discriminativo triangular en frutillas tratadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol (50:50) por contacto indirecto.

	Nanocompuestos de PEBD/MOM con carvacrol/timol ^a	Bionanocompuestos de ATP/MOM con carvacrol/timol ^b
Valor de <i>p</i>	< 0,001	< 0,001
¿Diferencia significativa?	No	No
Número de ensayos	26	26
Número de aciertos/desaciertos	10/16	10/16
Grado de diferencia percibida en los aciertos ^c	3,40 ± 1,45	3,40 ± 1,58
Grado de diferencia percibida en los desaciertos ^c	2,94 ± 0,83	2,44 ± 1,26

^a Film de 70 mm de diámetro, 1,35 ± 0,04 mm de espesor y de concentración *ca.* 13 mg g⁻¹ total de carvacrol/timol (50:50).

^b Film de 70 mm de diámetro, 1,95 ± 0,26 mm de espesor y de concentración *ca.* 6 mg g⁻¹ total de carvacrol/timol (50:50).

^c Grado de diferencia percibida por los jueces: 1 = muy leve diferencia; 2 = poca diferencia; 3 = moderada diferencia; 4 = mucha diferencia; 5 = muy notoria diferencia.

En la tabla 4.39 se muestran los resultados de esta prueba, y se aprecia que a las concentraciones de carvacrol/timol a las cuales fueron sometidas las muestras de frutillas durante su almacenamiento por dos días, no se producen cambios organolépticos que sean percibidos de manera significativa ($p < 0,001$) por jueces semi-entrenados. El número de aciertos por parte de los jueces que pudieron detectar correctamente las muestras diferentes, fue de 10 de un total de 26 tanto para PEBD/MOM como para ATP/MOM, por lo que este número de aciertos no es significativo para validar la hipótesis alternativa de que el número de aciertos en detectar la muestra diferente es diferente al azar (33,3 %).

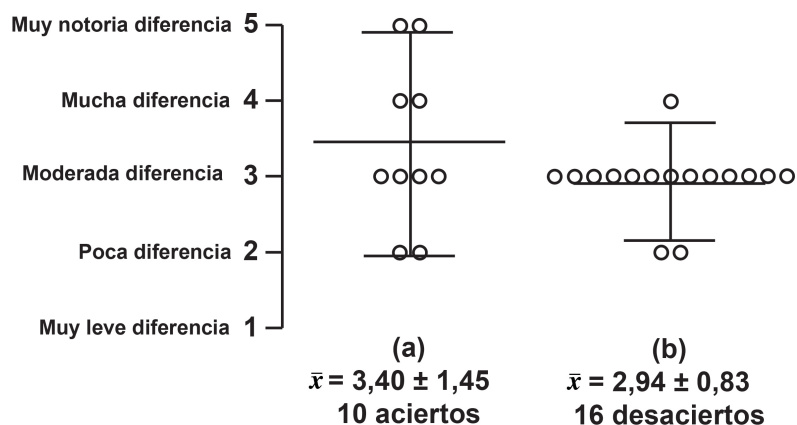


Figura 4.60. Resultados de prueba sensorial discriminativa triangular para tratamientos de frutillas con nanocompuestos de PEBD/MOM con 13 mg g^{-1} de mezcla carvacrol/timol (50:50) por 2 días a temperatura ambiente: nivel de diferencia \pm desviación estándar percibida por el juez en los (a) aciertos al detectar la muestra diferente, (b) en los desaciertos al elegir la muestra diferente ($n = 26$). Cada círculo en el gráfico es la calificación de un juez.

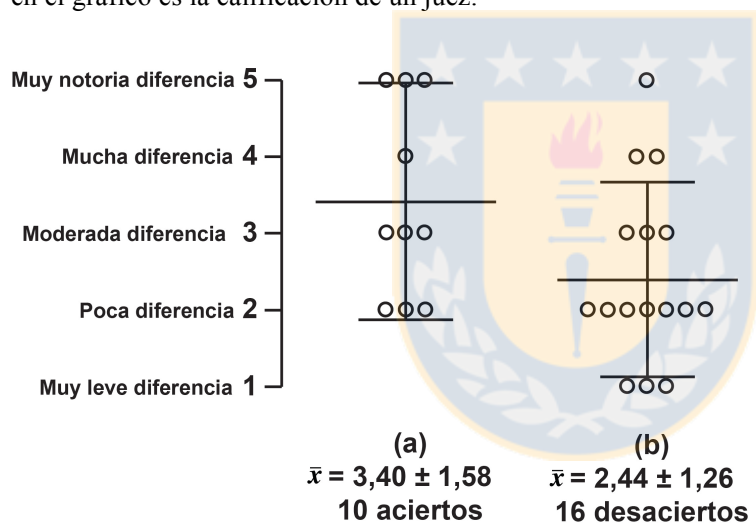


Figura 4.61. Resultados de prueba sensorial discriminativa triangular para tratamientos de frutillas con bionanocompuestos de ATP/MOM con $6,0 \text{ mg g}^{-1}$ de mezcla carvacrol/timol (50:50) por 2 días a temperatura ambiente: nivel de diferencia \pm desviación estándar percibida por el juez en los (a) aciertos al detectar la muestra diferente, (b) en los desaciertos al elegir la muestra diferente ($n = 26$). Cada círculo en el gráfico es la calificación de un juez.

En las figuras 4.60 y 4.61 se muestran de manera gráfica los resultados de esta prueba sensorial. Aquí se puede apreciar que el grado con el que los jueces notan la diferencia al elegir la muestra que ellos creen diferente varía para los aciertos y los desaciertos. En los aciertos por parte de los jueces, la notoriedad de la diferencia es percibida con mayor grado en comparación con los desaciertos, calificando la notoriedad de la muestra diferente con un promedio de 3,4 para ambos tipos de film, en comparación con la notoriedad de la diferencia al no acertar. Aunque las

calificaciones de notoriedad de diferencia con que los jueces perciben la muestra son mayores para los aciertos, estas diferencias no son estadísticamente significativas tanto para PEBD/MOM como para ATP/MOM cuando se aplica la prueba de *t* de Student dando un $p = 0,311$ y un $p = 0,099$ respectivamente para cada tratamiento.

4.5.5. Efecto antifúngico *in vivo* de nano/bionanocompuestos cargados con mezcla carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con *Rhizopus stolonifer* por contacto directo e indirecto con films.

Una vez determinada la concentración de carga de la mezcla carvacrol/timol en nano/bionanocompuestos que produce una CI_{50} sobre inóculos de conidias de *Botrytis cinerea* en frutillas, y que no conlleva a una alteración de las características organolépticas de las frutillas frente a un test sensorial discriminativo con un panel de jueces semi-entrenados, se sometió esta formulación optimizada a un ensayo antifúngico *in vivo* sobre frutillas inoculadas con conidias de *Rhizopus stolonifer*, para evaluar si esta formulación produce también una inhibición mayor al 50 % en este microorganismo.

En la figura 4.62 se observa que tanto para el empaque de frutillas en contacto directo y como por contacto indirecto con los films de nano/bionanocompuestos, la inhibición del crecimiento de *Rhizopus stolonifer* se mantiene menor al 50 % con respecto al control, por lo que se concluye que las CI_{50} obtenidas para *Botrytis* también son efectivas para *Rhizopus*. La figura 4.63 muestra un ejemplo de este experimento con *Rhizopus stolonifer*, y figura 4.64b muestra la microfotografía de una lesión.

Además en la figura 4.62b se puede apreciar que cuando los films de PEBD/MOM y ATP/MOM cargados con la CI_{50} de carvacrol/timol estudiadas para contacto indirecto con los films, son aplicados por contacto directo con las frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* se produce también una inhibición menor al 50 %, lo que indica que para las dos vías de aplicación en frutillas (contacto directo e indirecto) se obtienen inhibiciones exitosas de ambos agentes patógenos.

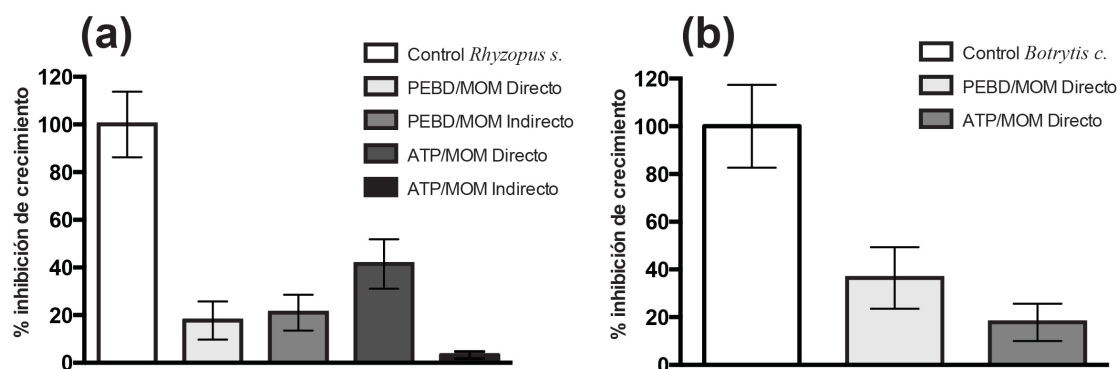


Figura 4.62. Efecto antifúngico de films de PEBD/MOM cargados con 13 mg g⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50) y films de ATP/MOM cargados con 6 mg g⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50) sobre (a) frutillas inoculadas con *Rhyzopus stolonifer* empacadas por cinco días a temperatura ambiente en contacto directo e indirecto con los films ($n = 12$), (b) sobre frutillas inoculadas con *Botrytis cinerea* empacadas por cinco días a temperatura ambiente en contacto directo con los films ($n = 12$).

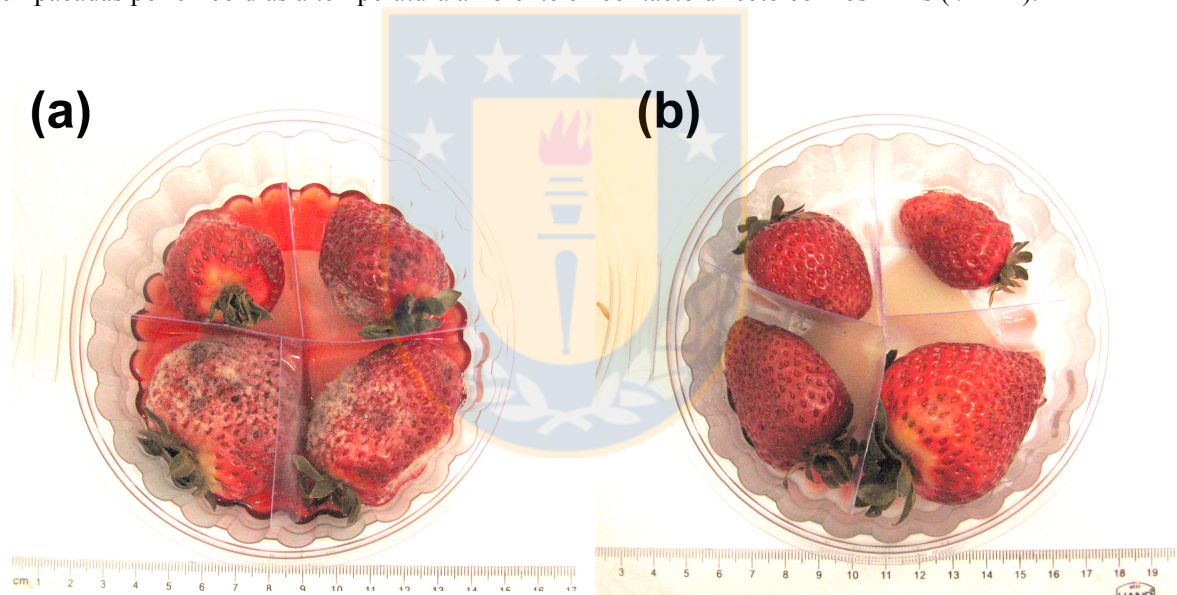


Figura 4.63. Efecto antifúngico de films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol sobre frutillas inoculadas con *Rhyzopus stolonifer* empacadas por cinco días, (a) control de frutillas inoculadas con *Rhyzopus stolonifer*, (b) frutillas inoculadas con *Rhyzopus stolonifer* y empacadas en contacto directo con films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con 13 mg g⁻¹ de mezcla carvacrol/timol (50:50).

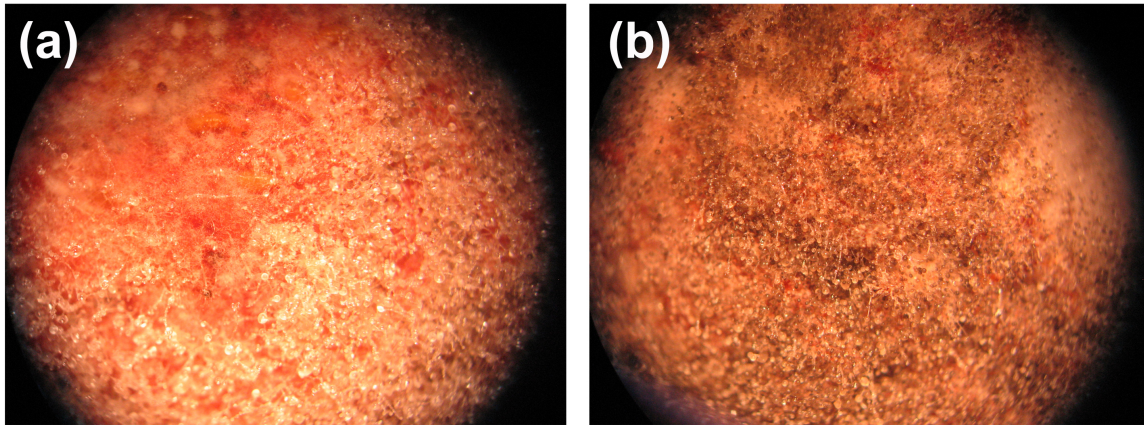


Figura 4.64. Microfotografías de (a) *Botrytis cinerea* en superficie de frutillas infectadas, (b) *Rhizopus stolonifer* en superficie de frutillas infectadas.

4.6. Evaluación de la calidad de frutillas (*Fragaria* × *ananassa*) empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol

Tras el análisis sensorial discriminativo de las frutillas tratadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con la CI_{50} de carvacrol/timol (50:50) para *Botrytis* y *Rhizopus*, la cual mostró no provocar alteración perceptible para jueces semi-entrenados, se procedió a evaluar algunos parámetros de calidad en las frutillas empacadas bajo estas condiciones. Parámetros de calidad como la apariencia externa del fruto o las propiedades de textura como la firmeza y la turgencia son fundamentales para definir a un fruto fresco como un producto de alta calidad, por lo que estos análisis permiten conocer el impacto en las propiedades físicas de la frutilla al ser tratadas con los empaques activos antimicrobianos.

4.6.1. Pérdida de masa

Durante el almacenamiento las frutas muestran una pérdida de masa producto principalmente por la pérdida de agua debido a los procesos de respiración y transpiración. En frutillas esta pérdida de masa es más alta que en otras frutas frescas y es una de las causas más importantes de deterioro de calidad, siendo una pérdida de masa de aproximadamente un 6 % el límite que determina su salida del mercado [132]. La pérdida de masa para las muestras de frutillas sometidas a empaque con films de nano/bionanocompuestos no superó en ninguno de los casos

el 6 % de pérdida (ver tabla 4.40). El tratamiento con films de PEBD/MOM no mostró una diferencia significativa con respecto a la pérdida de masa del control ($p < 0,05$) la cual fue de $0,11 \pm 0,35$ %. Aunque las muestras tratadas con films de ATP/MOM sí mostraron una pérdida significativa de masa comparado con el control con una diferencia media de masa de $-1,78 \pm 0,34$ % comparado con el control ($p < 0,05$), estas están por debajo del límite considerado de rechazo (ver figura 4.65). Esta diferencia significativa de pérdida de masa con respecto al control se puede deber a las propiedades higroscópicas del almidón, las cuales pueden acelerar la pérdida de agua en las frutillas tratadas.

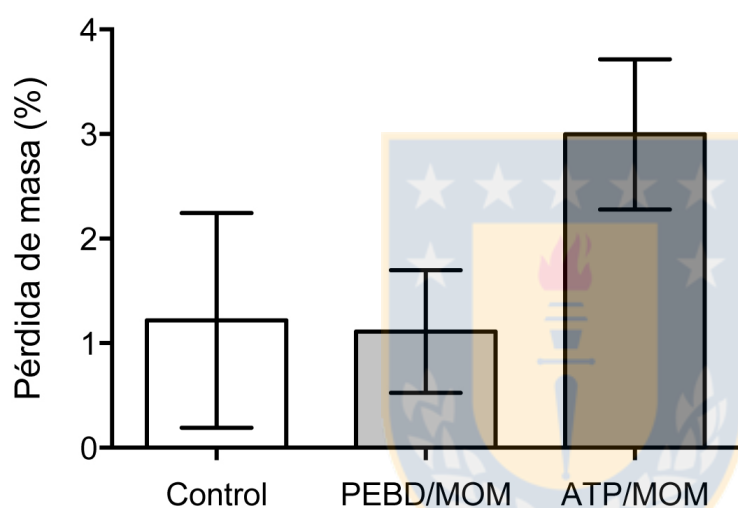


Figura 4.65. Gráfico de pérdida de masa de frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.

Tabla 4.40. Análisis de pérdida de masa de frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente, realizado por medio de ANOVA con test de comparación múltiple de Bonferroni ($\alpha = 5$ %).

	Control	PEBD/MOM	ATP/MOM
Diferencia de masa (%) ^a	1,22 ± 1,03 (9) ^b	1,11 ± 0,59 (11)	3,00 ± 0,72 (12)
Diferencia con respecto al control (%) ^c		0,11 ± 0,35	-1,78 ± 0,34
Intervalo confianza 95 % ^d		-0,72 a 0,91	-2,59 a -0,97
Valor de <i>t</i> (grados de libertad)		0,2994 (29)	5,1930 (29)
Diferencia significativa		No	Sí

^a Diferencia de masa en frutillas (%) antes y después del tratamiento con nano/bionanocompuestos.

^b Media de las diferencias (%) ± desviación estándar (*n*).

^c Diferencia de masa (%) antes y después del tratamiento con respecto al control.

^d Intervalo de confianza del 95 % de las diferencias de masa.

4.6.2. Color externo

Al momento de la elección por parte del consumidor, el color externo es uno de los principales atributos para seleccionar o aceptar un fruto, y es un parámetro crítico que puede usarse como índice de calidad para describir degradación de color. Este parámetro se puede evaluar objetivamente mediante la luminosidad (L^*) que indica el nivel de oscuridad que adquiere el fruto, el croma métrico (C^*) que indica el brillo del fruto, y el ángulo de tono métrico (h) que indica el cambio de color del fruto.

Tabla 4.41. Evaluación del cambio de color externo en frutillas empacadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.

	Media de las diferencias	p^a	Comparación con control ^c	Significancia ^d
Luminosidad (L^*)				
Control	1,770 ± 2,261 (12) ^b	0,020		
PEBD/MOM	1,593 ± 2,170 (12)	0,030	0,177 ± 0,905	No ($p = 0,847$)
ATP/MOM	2,729 ± 3,580 (12)	0,023	-0,959 ± 1,222	No ($p = 0,441$)
Croma métrica (C^*)				
Control	-2,043 ± 2,701 (12)	0,024		
PEBD/MOM	-2,312 ± 3,483 (12)	0,042	0,269 ± 1,272	No ($p = 0,835$)
ATP/MOM	-3,584 ± 4,148 (12)	0,012	1,811 ± 1,429	No ($p = 0,218$)
Ángulo de tono métrico (h)				
Control	-0,632 ± 2,023 (12)	0,303		
PEBD/MOM	-0,519 ± 2,225 (12)	0,436	-0,113 ± 0,868	No ($p = 0,898$)
ATP/MOM	-0,085 ± 2,358 (12)	0,903	-0,547 ± 0,897	No ($p = 0,548$)

^a Valor de p para la prueba t de Student que compara antes y después del tratamiento.

^b Media de las diferencias ± desviación estándar entre la medición de color individual de cada frutilla antes y después del tratamiento. Entre paréntesis en número de muestras (n).

^c Comparación entre la variación de color del tratamiento y la variación de color del control por medio de prueba de t de Student.

^d Significancia de la diferencia comparando el tratamiento con el control mediante prueba de t de Student.

En la tabla 4.41 se muestran los resultados obtenidos en los parámetros de color tras el empaque por dos días a temperatura ambiente de frutillas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol. Se aprecia que el parámetro L^* aumenta significativamente después del tiempo de empaque tanto para el control como para los tratamientos ($p < 0,05$), esto indica que hay un aclaramiento del fruto al pasar el tiempo de almacenamiento. El tratamiento que más produce aumento de luminosidad en las frutillas es con films de ATP/MOM. Ahora comparando el cambio de luminosidad de los tratamiento con films con respecto a los cambios de luminosidad con el control, se concluye que no difieren significativamente ($p < 0,05$), o sea que

el cambio que se produce en luminosidad al tratar las muestras con films, no difiere al que se produce cuando se tratan con control.

Los valores de croma métrica (C^*) muestran una reducción significativa ($p < 0,05$) con el tiempo tanto para control como para tratamientos, lo que indica que la brillantez de los frutos disminuye al avanzar tiempo de almacenamiento, lo cual puede ser debido a la pérdida de agua y secado de la superficie de las frutillas. Esta reducción de brillo también resultó ser mayor en los tratamientos con films de ATP/MOM, aunque no alcanzó una diferencia significativa con respecto al cambio que se produce con el control ($p < 0,05$). Los valores de ángulo de tono (h) no mostraron una diferencia significativa ni en el control ni en los tratamientos ($p > 0,05$).

La diferencia de color ΔE^*_{ab} aumenta con el tiempo de almacenamiento, pero al evaluar el grado de diferencia total de color entre las frutillas control y tratamiento – dado por ΔE^*_{ab} en el espacio color $L^*a^*b^*$ – se obtiene que no hay diferencia significativa ($p < 0,001$) entre el control y ambos tratamientos, indicando que el aumento del rojo y disminución del amarillo para los tratamientos con films no difiere del control. Los resultados se exponen en la tabla 4.42 y pueden apreciarse de manera gráfica en la figura 4.66.

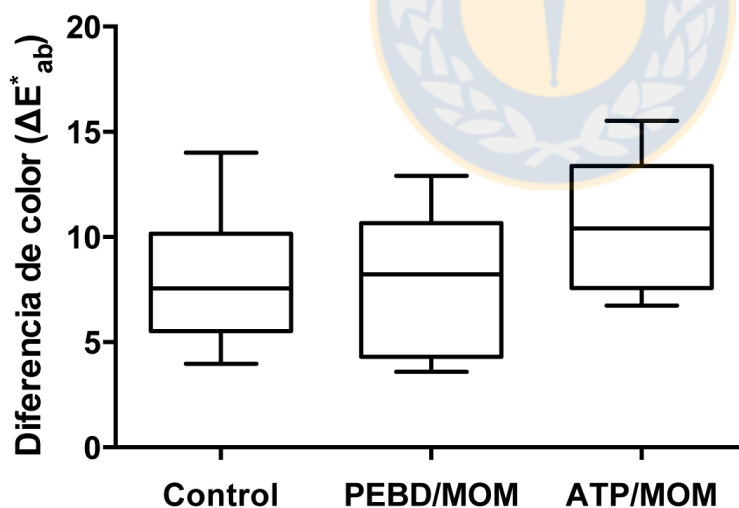


Figura 4.66. Diferencia de color (ΔE^*_{ab}) en frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.

Tabla 4.42. Análisis de diferencia de color (ΔE^*_{ab}) en frutillas empacadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente. Análisis realizado por medio de ANOVA con test de comparación múltiple de Bonferroni ($\alpha = 0,1 \%$).

ANOVA			
Valor de F	2,920		
Valor de p	0,0680		
¿Diferencia significativa? ^a	No		
Test de comparación múltiple de Bonferroni ($\alpha = 0,1 \%$)			
	Control	PEBD/MOM	ATP/MOM
Diferencia de color (ΔE^*_{ab}) ^b	7,865 \pm 2,944 (12) ^c	7,937 \pm 3,200 (12)	10,507 \pm 3,003 (12)
Diferencia con el control ^d		-0,072 \pm 1,246 ^e	-2,642 \pm 1,246
Intervalo confianza 95 % ^f		-4,879 a 4,732	-7,449 a 2,166
Valor de t (grados de libertad)		0,0575 (33)	2,1210 (33)
¿Diferencia significativa?		No	No

^a Diferencia significativa entre los tres tratamientos (control, PEBD/MOM y ATP/MOM).

^b Diferencia de color en frutillas antes y después del tratamiento con nano/bionanocompuestos.

^c Media de las diferencias \pm desviación estándar (n).

^d Diferencia de masa antes y después del tratamiento con respecto al control.

^e Media de las diferencias \pm error estándar.

^f Intervalo de confianza del 95 % de las diferencias de masa en los tratamientos.

4.6.3. Firmeza

La pérdida de firmeza es un factor que limita la calidad y la vida útil postcosecha en frutas y vegetales, siendo de gran importancia para frutillas. Las frutillas se ablandan durante la maduración por la degradación de la lamela de la pared celular del parénquima cortical, por el contacto célula-célula, y por la fuerza y turgencia de la pared celular [133].

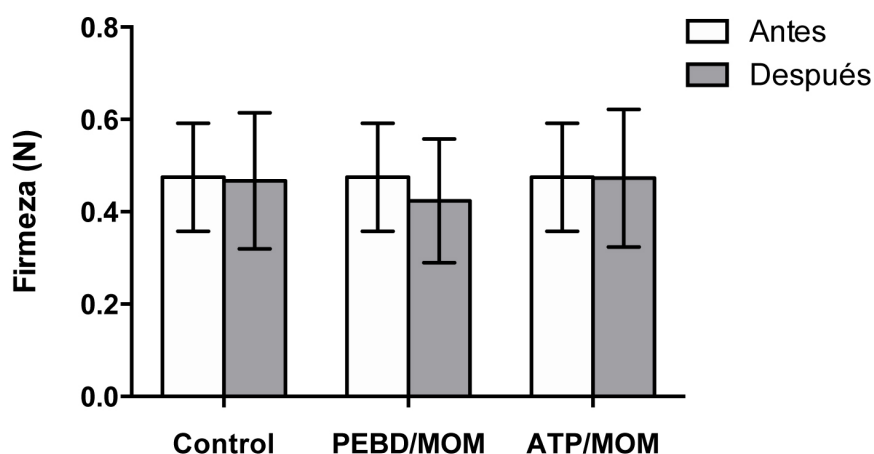


Figura 4.67. Análisis de firmeza en frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente.

Tabla 4.43. Análisis de firmeza en frutillas empacadas con films de nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol por 2 días a temperatura ambiente. Análisis mediante test múltiple de *t* de Student con significancia estadística determinada usando el método Holm-Sidak ($\alpha = 5\%$).

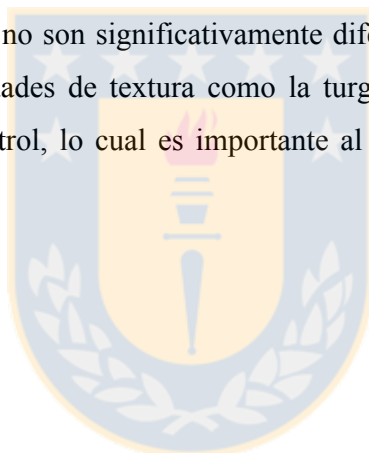
	Control	PEBD/MOM	ATP/MOM
Firmeza antes (N)	0,475 ± 0,117 (12) ^a	0,475 ± 0,117 (12)	0,475 ± 0,117 (12)
Firmeza después (N)	0,467 ± 0,147 (12)	0,424 ± 0,134 (12)	0,473 ± 0,149 (12)
Diferencia de firmeza (N) ^b	0,008 ± 0,054 ^c	0,051 ± 0,051	0,002 ± 0,054
Radio de <i>t</i> (grados de libertad)	0,1475 (22)	0,9931 (22)	0,0366 (22)
Valor de <i>p</i>	0,884	0,331	0,971
¿Diferencia significativa?	No	No	No

^a Media ± desviación estándar (*n*)

^b Diferencia de la firmeza antes y después del tratamiento

^c Diferencia ± error estándar de la diferencia

Al comparar las frutillas tratadas con nano/bionanocompuestos cargados con carvacrol/timol con respecto a las frutillas control, la tabla 4.43 muestra que los cambios en las propiedades de textura, en este caso firmeza, no son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ver figura 4.67). Esto muestra que las propiedades de textura como la turgencia no se ven significativamente alterados con respecto al control, lo cual es importante al momento de tener un fruto de alta calidad.



CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones

A partir de los resultados anteriormente expuestos se extraen de manera resumida las siguientes conclusiones:

Se logró sintetizar exitosamente films de nano/bionanocompuestos de PEBD/MOM y ATP/MOM por método de mezclado en estado fundido y por método de extrusión respectivamente, los cuales mostraron niveles de intercalación y/o exfoliación corroborados por DRX y microscopía electrónica, y que mostraron propiedades de empaque (mecánicas, térmicas y reológicas) mejoradas con respecto a los polímeros solos.

La optimización de las propiedades de empaque para los films de nano/bionanocompuestos (propiedades morfológicas, mecánicas, térmicas y reológicas) fue lograda de manera efectiva y sistemática al ocupar diseño de experimentos (DOE), calibración multivariada por PLSR y metodología superficie respuesta (RSM). Para los films de nanocompuestos de PEBD/MOM se concluyó que la formulación y condiciones de síntesis para la propiedades de empaque óptimas fueron: %Arcilla = 3,1 %m/m Nanomer[®] I.44P (modificada con dimetil dialquil (C14–C18) amina), %Comp. = 4,0 %m/m, $T_{\text{mix}} = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{mix}} = 7\text{ min}$, y $v_{\text{mix}} = 50\text{ rpm}$. En el caso de films de bionanocompuestos de ATP/MOM se concluyó que la formulación y condiciones de síntesis para la propiedades de empaque óptimas fueron: %Arcilla = 5,0 %m/m Nanomer[®] montmorillonita sódica, %Plastif. = 40 %m/m, Glicerina/Agua = 25/75, $T_{\text{mix}} = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$, y $v_{\text{mix}} = 50\text{ rpm}$.

Mediante pruebas *in vitro* se logró evaluar la capacidad antifúngica de los principios activos derivados de aceites esenciales carvacrol y timol cargados en los films de nano/bionanocompuestos. Se logró establecer que estos films inhiben el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* tanto por contacto directo de los films como por acción indirecta debido a la generación de vapores del principio activo en el ambiente circundante. Las concentraciones de

carvacrol y timol en las formulaciones de nano/bionanocompuestos que producen una CI_{50} *in vitro* son aproximadamente de 2 a 3 %m/m para ambas vías de contacto.

En los estudios de control de liberación de carvacrol hacia el simulador de alimentos se observó que para PEBD/MOM sigue una difusión de tipo Fickiana, y en el caso de ATP/MOM se produce una interacción del almidón termoplástico con la solución acuosa del simulador de alimento que produce un hinchamiento y generación de microfisuras en el film, lo que resulta en una difusión no Fickiana de la droga, no siendo posible calcular los parámetros cinéticos con este tipo de simulador, y generándose una liberación de tipo *burst*.

Para la liberación de carvacrol desde films de PEBD/MOM en el simulador de alimento se observó que los valores de coeficiente de difusión D disminuyen con respecto al polímero solo, junto con los otros parámetros de cinética y difusión v_0 , k_1 y k_d . Mediante DOE y PLSR se concluyó que las variables que controlan la liberación de carvacrol en PEBD/MOM son principalmente el nivel de intercalación al producirse “camino tortuosos” en la matriz polimérica, lo que se logra mayormente con la nanoarcilla modificada con dimetil dialquil (C14–C18) amina, la cual debe estar en una concentración similar a la del compatibilizante (razón próxima a 1:1) con lo que se logra la mejor intercalación en las formulaciones.

La pérdida de carvacrol por volatilización hacia el ambiente desde los films de nano/bionanocompuestos mostró que para ambos materiales sigue una cinética de primer orden. En los films de PEBD/MOM el control de la retención también se dió por el mayor nivel de intercalación en la matriz, pero además se puede diferenciar las variables que controlan la liberación a corto y largo plazo. A corto plazo, esta liberación está dominada principalmente por la interacción nanoarcilla/carcacrol, la cual se da principalmente por adsorción, y la de largo plazo controlada por la intercalación de la matriz. Para la pérdida de carvacrol desde films de ATP/MOM se observó que es más rápida que para PEBD/MOM debido a la menor afinidad del carvacrol por la matriz hidrofílica del almidón termoplastificado, siendo la exfoliación de la matriz la principal variable que controla esta liberación.

La disminución de la temperatura produce una disminución significativa en los coeficientes de difusión de carvacrol para ambos materiales de nano/bionanocompuestos, tanto hacia el simulador de alimento como en la volatilización hacia el ambiente independiente de la nanoarcilla utilizada. Ambos materiales a temperatura de refrigeración y congelación pueden retener en promedio más del 60 – 70 % del carvacrol cargado al cabo de 2 meses de almacenamiento, con valores de $\theta_{1/2}$ que aumentan hasta 10 veces en promedio para PEBD/MOM, y hasta 4 veces en promedio para ATP/MOM. Esta diferencia se debería a la poca afinidad del carvacrol con esta matriz hidrofílica del ATP, a diferencia de la alta afinidad que tiene con la matriz orgánica lipofílica de PEBD, lo cual coincide con los mayores valores de E_a para PEBD/MOM en comparación con ATP/MOM. Esta disminución en la liberación de carvacrol a bajas temperaturas se puede aprovechar como un “tiempo de guarda” para este material antes de ser usado.

Teniendo las formulaciones de films de nano/bionanocompuestos con sus propiedades de empaque y de control de liberación optimizadas para carvacrol, se determinaron las CI_{50} *in vivo* de estos materiales cargados con carvacrol sobre frutillas inoculadas con conidias de *Botrytis cinerea* empacadas a temperatura ambiente en envases de prueba con contacto indirecto con los films. Las CI_{50} calculadas fueron de 40,45 mg g⁻¹ de film para PEBD/MOM y de 14,16 mg g⁻¹ de films para ATP/MOM por generación de vapores de carvacrol en el espacio cabeza del envase. La aplicación de estas concentraciones mostró mediante pruebas de análisis sensorial de aceptación que las frutillas sufrían una alteración, perceptible por un panel de jueces no entrenados, en las características organolépticas como el olor y el sabor.

Con la adición de timol en la formulación formando una mezcla 50:50 con carvacrol se logró disminuir las CI_{50} *in vivo* totales de principio activo en cerca de un 50 – 60 % sobre *Botrytis cinerea* inoculadas en frutillas. Esto se debe al efecto sinérgico/aditivo en la capacidad antifúngica que se reporta tanto *in vitro* como *in vivo* para estos terpenoides cuando se asocian en mezcla frente a microorganismos patógenos. Estas nuevas CI_{50} *in vivo* de carvacrol/timol (50:50) en film fueron de 13,23 mg g⁻¹ para PEBD/MOM y de 5,90 mg g⁻¹ para ATP/MOM mediante contacto indirecto por generación de vapores de principio activo en el espacio cabeza de los envases de prueba.

La aplicación de estas concentraciones en mezcla de carvacrol/timol mostró, mediante pruebas de análisis sensorial discriminativo con panel de jueces semi-entrenados, que las frutillas no sufrían de alteración significativa en sus características organolépticas ($p < 0,05$), por lo que se logró equilibrar el efecto antifúngico *in vivo* sobre el principal agente patógeno con la mínima alteración organoléptica de los frutos.

Estas formulaciones de films de nano/bionanocompuestos cargados con CI_{50} de la mezcla carvacrol/timol se aplicaron también en ensayos *in vivo* para medir su efecto antifúngico en frutillas inoculadas con conidias de *Rhizopus stolonifer*, tanto por contacto directo con los films, como por efecto de sus vapores por contacto indirecto. Estas concentraciones CI_{50} para ambos tipos de films demostraron ejercer también una inhibición por sobre el 50 % para *Rhizopus*, por lo que no fue necesario el incremento de las concentraciones de carvacrol/timol para inhibir este segundo agente patógeno. Además, los films con estas CI_{50} también mostraron similar nivel de inhibición para *Botrytis cinerea* por contacto directo.

El análisis de calidad de frutillas sometidas a empaque a temperatura ambiente con films de nano/bionanocompuestos cargados con las CI_{50} de carvacrol/timol (50:50) obtenida *in vivo* para *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, no mostró cambios significativos ($p < 0,05$) en los parámetros de cambio de color externo y firmeza con respecto a frutillas control. En el caso de la evaluación de pérdida de masa se observó que los films de bionanocompuestos ATP/MOM sí produjeron una pérdida de masa estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al control, aunque esta pérdida es menor al 6 %, el cual es el parámetro de aceptación máxima para pérdida de masa en frutillas. Todo esto conlleva a que el tratamiento de las frutillas en el tiempo de contacto con el material de empaque antimicrobiano no produce cambios significativos en su calidad, lo que permite proyectar a futuro estos materiales como un potencial material de empaque activo para frutos de alta calidad.

Las conclusiones expuestas indican que tanto nanocompuestos sintéticos de PEBD/MOM como su alternativa no sintética de bionanocompuestos de ATP/MOM tienen potencial como material de empaque activo para frutillas frescas, poseyendo efecto antifúngico sobre los principales

microorganismos que las alteran durante su almacenamiento, contando además con propiedades de liberación controlada de principios activos de aceites esenciales.

5.2. Perspectivas

A pesar del trabajo y las conclusiones expuestas, quedan ciertos tópicos y aristas del presente trabajo de tesis doctoral que se pueden proyectar a futuro como una siguiente etapa de investigación:

Evaluar las propiedades de permeabilidad a gases (oxígeno, dióxido de carbono, vapor de agua, etileno) y las propiedades ópticas de los nano/bionanocompuestos.

Evaluar la liberación de estos principios activos con formulaciones de nano/bionanocompuestos con mezclas de diferentes nanoarcillas. Se ha visto que las diferentes organomodificaciones en las nanoarcillas impactan en la interacción nanoarcilla/carvacrol por lo que la liberación se puede controlar de mejor manera incorporando más de un tipo de nanoarcilla a la formulación, por un lado una nanoarcilla que impacte en la intercalación, y otro tipo una nanoarcilla que tenga mayor interacción con carvacrol para aumentar su retención.

Evaluar el efecto antifúngico de estos materiales en otros berries y otras frutas frescas ya que los microorganismos estudiados son comunes para la mayoría de las frutas producidas en el país.

Evaluar diferentes proporciones de carvacrol:timol en las formulaciones para así disminuir aun más las CI_{50} , y evaluar la liberación de los principio activos a bajas temperaturas, de modo de optimizar el control de liberación a diferentes temperaturas de refrigeración.

Estudiar de efecto antifúngico *in vivo* de estos films a temperatura de refrigeración sobre los microorganismos estudiados. Además, realizar un estudio de cómo incluir films en envases modelos que posean amplia ventilación, y cómo generar atmósferas de vapores de carvacrol/timol en envases semi-abiertos que optimicen la respiración del fruto.

REFERENCIAS

- [1] Asociación de Empresas de Alimentos de Chile, 2014. Disponible en: <http://www.chilealimentos.com/2013/index.php/es/ventajas-de-chile/chile-potencia-alimentaria.html>
- [2] “Gobierno envía proyecto para convertir a Chile en potencia agroalimentaria mundial”. La Nación, Chile, miércoles 16 de octubre de 2013. Disponible en: <http://www.lanacion.cl/gobierno-envia-proyecto-para-convertir-a-chile-en-potencia-agroalimentaria-mundial/noticias/2013-10-16/133600.html>
- [3] Olivares Muñoz, A. Subgerente de Competitividad – CORFO. Seminario Taller sobre Experiencias de Articulación Productiva. *Clusters y Políticas de Articulación Productiva en Chile*. Ciudad de Guatemala, Guatemala, 19 – 20 de septiembre 2013.
- [4] ODEPA – Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile, 2014. Disponible en: www.odepa.cl
- [5] Chilean Fresh Fruit Association, Chile, 2014. Disponible en: www.fruitsfromchile.com
- [6] Agrimundo – Inteligencia Competitiva para el sector Agroalimentario. *Perspectivas para los berries nativos en el mercado internacional*. Reporte N°1. ODEPA. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Diciembre 2013.
- [7] Almenar E, Hernández-Muñoz P, Lagarón JM, Catalá R, Gavara R. *Controlled atmosphere storage of wild strawberry fruit (Fragaria vesca L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 86–91 (2006).
- [8] *Estrategias Regionales de Competitividad por Rubro: 2005 – Producción y mercado de la frutilla*. Informe INDAP. Instituto de Desarrollo Agropecuario. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile, 2005. Disponible en: <http://www.indap.gob.cl/extras/estrategias-por-rubros-2005/5region/9Frutillas-Produccion.Mercado.pdf>
- [9] Nadas A, Olmo M, García JM. *Growth of Botrytis cinerea and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres*. Journal of Food Science 68(5): 1798–1802 (2003).
- [10] Velázquez-del Valle MG, Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Guerra-Sánchez MG, Amora-Lazcano E. *Estrategias de control de Rhizopus stolonifer Ehrenb. (Ex. Fr.) lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas*. Revista Mexicana de Fitopatología 26(1): 49–55 (2008).

- [11] Kim HJ, Lee SH, Kim CS, Lim EK, Choi KH, Kong HG, Kim DW, Lee SW, Moon BJ. *Biological control of strawberry gray mold caused by Botrytis cinerea using Bacillus licheniformis N1 formulation*. Journal of Microbiology and Biotechnology 17(3): 438–444 (2007).
- [12] Liu Z, Zeng M, Dong S, Xu J, Song H, Zhao Y. *Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (Botrytis cinerea) on harvested strawberries*. Postharvest Biology and Technology 46: 95–98 (2007).
- [13] Huang R, Li Q, Zhang J, Yang L, Che HJ, Jiang DH, Huang HC. *Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of Candida intermedia*. Disease Control and Pest Management 101(7): 859–869 (2011).
- [14] The American Phytopathological Society, EE.UU, 2014. Disponible en: <http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/Graymoldstrawberry.aspx>
- [15] Ficha técnica: Teldor[®] – Botricida para tratamientos en pre y post-cosecha. Bayer CropScience Chile, 2010. Disponible en: http://www.bayercropscience.cl/upfiles/folletos/Teldor2010_Baja%281%29.pdf
- [16] McMillin KW. *Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat*. Meat Science 80: 43–65 (2008).
- [17] Roberts RG. *Postharvest biological control of gray mold of apple by Cryptococcus laurentii*. Postharvest Pathology and Mycotoxins 80(6): 526–530 (1990).
- [18] Lima G, Ippolito A, Nigro F, Salerno M. *Effectiveness of Aureobasidium pullulans and Candida oleophila against postharvest strawberry rot*. Postharvest Biology and Technology 10: 169–178 (1997).
- [19] Appendini P, Hotchkiss JH. *Review of antimicrobial food packaging*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 3: 113–126 (2002).
- [20] Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. *Antimicrobial herb and spice compounds in food*. Food Control 21: 1199–1218 (2010).
- [21] Burt S. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food—a review*. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253 (2004).
- [22] Busatta C, Vidal RS, Popiolski AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MRA, Corazza FC, Corazza ML, Oliveira JV, Cansian RL. *Application of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage*. Food Microbiology 25: 207–211 (2008).

- [23] Kumar A, Shukla R, Singh P, Prasad CS, Dubey NK. *Assessment of Thymus vulgaris L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 9: 575–580 (2008).
- [24] Gutierrez J, Bourke P, Lonchamp J, Barry-Ryan C. *Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 10: 195–202 (2009).
- [25] Holley RA, Patel D. *Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials*. Food Microbiology 22: 273–292 (2005).
- [26] Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. *Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 4863–4870 (2007).
- [27] Phillips CA, Laird K, Allen SC. *The use of Citri-VTM® – An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger and Alternaria alternata in vitro and on food*. Food Research International 47: 310–314 (2012).
- [28] Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkrabek J. *Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria*. Food Control 20: 157–160 (2009).
- [29] Tunc S, Chollet E, Chalier P, Preziosi-Belloy L, Gontard N. *Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of Penicillium notatum*. International Journal of Food Microbiology 113: 263–270 (2007).
- [30] Pasten N, Juven BJ, Shaaya E, Menasherov M, Nitzan R, Weisslowicz H, Ravid U. *Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria*. Letters in Applied Microbiology 11(1): 33–37 (1990).
- [31] Reyes-Jurado F, Palou E, López-Malo A. *Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 6(1): 29–39 (2012).
- [32] Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. *Antioxidant actions of thymol, carvacrol 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol*. Food and Chemical Toxicology 32(1): 31–36 (1994).
- [33] Mezzoug N, Elhadri A, Dallouh A, Amkiss S, Skali NS, Abrini J, Zhiri A, Baudoux D, Diallo B, El Jaziri M, Idaomar M. *Investigation of the mutagenic and antimutagenic*

- effects of Origanum compactum essential oil and some of its constituents*. Mutation Research 629(2): 100–110 (2007).
- [34] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. *Biological effects of essential oils – A review*. Food and Chemical Toxicology 46: 446–475 (2008).
- [35] Aydin S, Basaran AA, Basaran N. *The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C*. Mutation Research 581(1–2): 43–53 (2005).
- [36] López P, Sánchez C, Batlle R, Nerín C. *Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 4348–4356 (2007).
- [37] Wang CY, Wang SY, Yin JJ, Parry J, Yu LL. *Enhancing antioxidant, antiproliferation, and free radical scavenging activities in strawberries with essential oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 6527–6532 (2007).
- [38] Thompson DP. *Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi*. Mycologia 81(1): 151–153 (1989).
- [39] Roller S, Seedhar P. *Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 °C and 8 °C*. Letters in Applied Microbiology 35: 390–394 (2002).
- [40] Vázquez BI, Fente C, Franco CM, Vázquez MJ, Cepeda A. *Inhibitory effects of eugenol and thymol on Penicillium citrinum strains in culture media and cheese*. International Journal of Food Microbiology 67(1–2): 157–163 (2001).
- [41] Tzortzakis NG. *Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10: 97–102 (2009).
- [42] Soylyu EM, Kurt S, Soylyu S. *In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology 143: 183–189 (2010).
- [43] Reddy MVB, Angers P, Gosselin A, Arul J. *Characterization and use of essential oils from Thymus vulgaris against Botrytis cinerea and Rhizopus stolonifer in strawberry fruits*. Phytochemistry 47(8): 1515–1520 (1998).

- [44] Martínez-Romero D, Guillén F, Valverde JM, Bailén G, Zapata P, Serrano M, Castillo S, Valero D. *Influence of carvacrol on survival of Botrytis cinerea inoculated in table grapes*. International Journal of Food Microbiology 115(2): 144–148 (2007).
- [45] Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. *Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi*. Journal de Mycologie Médicale 24: 51–56 (2014).
- [46] Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. *A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol*. Journal of Applied Microbiology 91: 453–462 (2001).
- [47] Burt SA, Vlieland R, Haagsman HP, Veldhuizen EJA. *Increase in activity of essential oils components carvacrol and thymol against Escherichia coli O157:H7 by addition of food stabilizers*. Journal of Food Protection 68(5): 919–926 (2005).
- [48] Goñi P, López P, Sánchez C, Gómez-Lus R, Becerril R, Nerín C. *Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils*. Food Chemistry 116: 982–989 (2009).
- [49] Valero D, Valverde JM, Martínez-Romero D, Guillén F, Castillo S, Serrano M. *The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes*. Postharvest Biology and Technology 41: 317–327 (2006).
- [50] Skandamis PN, Nychas GJE. *Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions*. International Journal of Food Microbiology 79: 35–45 (2002).
- [51] Chouliara E, Karatapanis A, Savvaidis IN, Kontominas MG. *Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C*. Food Microbiology 24: 607–617 (2007).
- [52] Brody AL, Bugusu B, Han JH, Sand CK, McHugh TH. *Innovative food packaging solutions*. Journal of Food Science 73(8): 107–116 (2008).
- [53] Tovar L, Salafranca J, Sánchez C, Nerín C. *Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(13): 5270–5275 (2005).

- [54] Smith JP, Ooraikul B, Koersen WJ, van de Voort FR, Jackson ED, Lawrence RA. *Shelf life extension of a bakery product using ethanol vapor*. Food Microbiology 4(4): 329–337 (1987).
- [55] Miller WR, Spalding DH, Risse LA, Chew V. *The effects of an imazalil-impregnated film with chlorine and imazalil to control decay of bell peppers*. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 97: 108–111 (1984).
- [56] Haynie SL, Crum GA, Doele BA. *Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water insoluble resin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39(2): 301–307 (1995).
- [57] Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. *Antibacterial action of chitosan*. Food Biotechnology 6(3): 257–272 (1992).
- [58] Ozdemir M, Floros JD. *Active food packaging technologies*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44: 185–193 (2004).
- [59] Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. *Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications*. Journal of Food Science 68(2): 408–420 (2003).
- [60] Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, Zondervan-van den Beuken E, Tobback P. *Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns*. Trends in Food Science & Technology 19: S103–S112 (2008).
- [61] Ramos M, Jiménez A, Peltzer M, Garrigós MC. *Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging*. Journal of Food Engineering 109: 513–519 (2012).
- [62] Peltzer M, Wagner J, Jiménez A. *Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging*. Food Additives and Contaminants 26(6): 938–946 (2009).
- [63] Emiroglu ZK, Yemis GP, Coskun BK, Candogan K. *Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties*. Meat Science 86: 283–288 (2010).
- [64] Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Dalla Rosa M. *Biodegradable polymers for food packaging: a review*. Trends in Food Science & Technology 19: 634–643 (2008).

- [65] Reddy MM, Gupta RK, Bhattacharya SN, Parthasarathy R. *Structure-property relationship of melt intercalated maleated polyethylene nanocomposites*. Korea-Australia Rheology Journal 19(3): 133–139 (2007).
- [66] Ludueña L, Vázquez A, Alvarez V. *Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications*. Carbohydrate Polymers 87: 411–421 (2012).
- [67] Pankaj SK, Bueno-Ferrer C, Misra NN, O'Neill L, Jiménez A, Bourke P, Cullen PJ. *Characterization of polylactic acid films for food packaging as affected by dielectric barrier discharge atmospheric plasma*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 21: 107–113 (2014).
- [68] Fabra MJ, López-Rubio A, Lagaron JM. *On the use of different hydrocolloids as electrospun adhesive interlayers to enhance the barrier properties of polyhydroxyalkanoates of interest in fully renewable food packaging concepts*. Food Hydrocolloids 39: 77–84 (2014).
- [69] Jbilou F, Joly C, Galland S, Belard L, Desjardin V, Bayard R, Dole P, Degraeve P. *Biodegradation study of plasticized corn flour/poly(butylene succinate-co-butylene adipate) blends*. Polymer Testing 32: 1565–1575 (2013).
- [70] Majeed K, Jawaid M, Hassan A, Abu-Bakar A, Abdul Khalil HPS, Salema AA, Inuwa I. *Potential materials for food packaging from nanoclay/natural fibres filled hybrid composites*. Materials and Design 46: 391–410 (2013).
- [71] Sozer N, Kokini JL. *Nanotechnology and its applications in the food sector*. Trends in Biotechnology 27(2): 82–89 (2009).
- [72] Pavlidou S, Papaspyrides CD. *A review on polymer-layered silicate nanocomposites*. Progress in Polymer Science 33(12): 1119–1198 (2008).
- [73] Tjong SC. *Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites*. Materials Science and Engineering R 53: 73–197 (2006).
- [74] Alexandre M, Dubois P. *Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials*. Materials Science and Engineering 28: 1–63 (2000)
- [75] Paul DR, Robeson LM. *Polymer nanotechnology: Nanocomposites*. Polymer 49: 3187–3204 (2008).

- [76] De Azeredo HMC. *Nanocomposites for food packaging applications*. Food Research International 42: 1240–1253 (2009).
- [77] Chivrac F, Pollet E, Avérous L. *Progress in nano-biocomposites based on polysaccharides and nanoclays*. Materials Science and Engineering R 67: 1–17 (2009).
- [78] Morawiec J, Pawlak A, Slouf M, Galeski A, Piorkowska E, Krasnikowa N. *Preparation and properties of compatibilized LDPE/organo-modified montmorillonite nanocomposites*. European Polymer Journal 41:1115–1122 (2005).
- [79] Liang G, Xu J, Bao S, Xu W. *Polyethylene/maleic anhydride grafted polyethylene/organic-montmorillonite nanocomposites. I. Preparation, microstructure, and mechanical properties*. Journal of Applied Polymer Sciences 91: 3974–3980 (2004).
- [80] Pandey JK, Reddy KR, Kumar AP, Singh RP. *An overview on the degradability of polymer nanocomposites*. Polymer Degradation and Stability 88(2): 234–250 (2005).
- [81] Sorrentino A, Gorrasi G, Vittoria V. *Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications*. Trends in Food Science & Technology 18: 84 – 95 (2007).
- [82] Dean K, Yu L, Wu DY. *Preparation and characterization of melt-extruded thermoplastic starch/clay nanocomposites*. Composites Science and Technology 67: 413–421 (2007).
- [83] Avella M, De Vlieger JJ, Errico ME, Fischer S, Vacca P, Volpe MG. *Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications*. Food Chemistry 93: 467–474 (2005).
- [84] Park HM, Li X, Jin CZ, Park CY, Cho WJ, Ha CS. *Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids*. Macromolecular Materials and Engineering 287: 553–558 (2002).
- [85] Chen B, Evans JRG. *Thermoplastic starch-clay nanocomposites and their characteristics*. Carbohydrate Polymers 61: 455–463 (2005).
- [86] Singh B, Sharma DK, Kumar R, Gupta A. *Controlled release of the fungicide thiram from starch-alginate-clay based formulation*. Applied Clay Science 45: 76–82 (2009).
- [87] Wang Q, Hu X, Du Y, Kennedy JF. *Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release*. Carbohydrate Polymers 82: 842–847 (2010).
- [88] Barzegar H, Azizi MH, Barzegar M, Hamidi-Esfahani Z. *Effect of potassium sorbate on antimicrobial and physical properties of starch-clay nanocomposite films*. Carbohydrate Polymers 110: 26–31 (2014).

- [89] Tunc S, Duman O. *Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release*. LWT – Food Science and Technology 44: 465–472 (2011).
- [90] Aguzzi C, Cerezo P, Viseras C, Caramella C. *Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations*. Applied Clay Science 36: 22–36 (2007).
- [91] Mascheroni E, Chalier P, Gontard N, Gastaldi E. *Designing of a wheat gluten/montmorillonite based system as carvacrol carrier: Rheological and structural properties*. Food Hydrocolloids 24: 406–413 (2010).
- [92] Kourwel KK, Cran MJ, Sonneveld K, Miltz J, Bigger SW. *Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant*. LWT-Food Science and Technology 50: 432–438 (2013).
- [93] Sanchez-Garcia MD, Lopez-Rubio A, Lagaron JM. *Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications*. Trends in Food Science & Technology 21(11): 528–536 (2010).
- [94] Persico P, Ambrogi V, Carfagna C, Cerruti P, Ferrocino I, Mauriello G. *Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging*. Polymer Engineering and Science 49: 1447–1455 (2009).
- [95] Tang X, Alavi S, Herald TJ. *Effects of plasticizers on the structure and properties of starch-clay nanocomposite films*. Carbohydrate Polymers 74: 552–558 (2008).
- [96] McGlashan SA, Halley PJ. *Preparation and characterization of biodegradable starch-based nanocomposite materials*. Polymer International 52: 1767–1773 (2003).
- [97] Viñas P, Soler-Romera MJ, Hernández-Córdoba M. *Liquid chromatography determination of phenol, thymol and carvacrol in honey using fluorimetric detection*. Talanta 69: 1063–1067 (2006).
- [98] Soothill JS, Ward R, Girling AJ. *The IC₅₀: an exactly defined measure of antibiotic sensitivity*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 29: 137–139 (1992).
- [99] Commission Directive 97/48/EC del 29 de Julio 1997 enmendada por segunda vez en el Consejo Directivo 82/711/EEC asentando las reglas básicas necesarias para las pruebas de migración de sustancias presentes en materiales plásticos y de artículos que que estén en contacto con los alimentos (97/48/EC). Official Journal of the European Communities, L 222, 210e215.

- [100] Anzaldúa-Morales A. *La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y la Práctica*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España (1994).
- [101] Norma ISO 4120-1983 (E). *Sensory Analysis – Methodology – Triangular Test*. International Standard Organization. 1ra edición. Suiza (1983).
- [102] Olivas-Gastélum R. *Comparación y evaluación de las pruebas de Diferente Dúo–Trío, Triangular, ABX e Igual Diferente*. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 2: 66–80 (2008).
- [103] Fan Y, Xu Y, Wang D, Zhang L, Sun J, Sun L, Zhang B. *Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality*. *Postharvest Biology and Technology* 53: 84–90 (2009).
- [104] *Measuring color using Hunter L, a, b versus CIE 1976 L* a* b**. Application note AN 1005.00 Hunter Associates Laboratory Inc. (2012).
- [105] Color Measurement Basics – Color Spaces. Konica Minolta. Disponible en: <http://sensing.konicaminolta.asia/learning-center/color-measurement/color-spaces/>
- [106] Leardy R. *Experimental design in chemistry: A tutorial*. *Analytica Chimica Acta* 652: 161–172 (2009).
- [107] Sinha-Ray S, Okamoto M. *Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing*. *Progress in Polymer Science* 28: 1539–1641 (2003).
- [108] Bruns RE, Scarminio IS, de Barros-Neto B. *Statistical Design – Chemometrics*, 1ra edición, Elsevier, Amsterdam (2006).
- [109] Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-World N, Wikström C, Wold S. *Design of Experiments: Principles and Applications*. 3ra edición. Umetrics, Stockholm. (2000).
- [110] Malucelli G, Ronchetti S, Lak N, Priola A, Dintcheva NT, La Mantia FP. *Intercalation effects in LDPE/o-montmorillonites nanocomposites*. *European Polymer Journal* 43: 328–335 (2007).
- [111] Pereira de Abreu DA, Losada PP, Angulo I, Cruz JM. *Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging*. *European Polymer Journal* 43: 2229–2243 (2007).
- [112] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. *Talanta* 76: 965–977 (2008).

- [113] Wold S, Sjöström M, Eriksson L. *PLS-regression: a basic tool for chemometrics*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 58: 109–130 (2001).
- [114] Geladi P, Kowalski BR. *Partial least-squares regression: A tutorial*. Analytica Chimica Acta 185: 1–17 (1986).
- [115] Box G, Hunter JS, Hunter WG. *Statistics for Experimenters – Design, Innovation, and Discovery*. 2da edición, Wiley-Interscience, New Jersey (2005).
- [116] Campos-Requena VH, Rivas BL, Pérez MA, Contreras D, Muñoz E. *Optimization of processing parameters for the synthesis of low-density polyethylene/organically modified montmorillonite nanocomposites using X-ray diffraction with experimental design*. Polymer International 62: 548–553 (2013).
- [117] Campos-Requena VH, Rivas BL, Pérez MA, Wilhelm M. *Application of design of experiments, response surface methodology and partial least squares regression on nanocomposite synthesis*. Polymer Bulletin 71: 1961–1082 (2014).
- [118] Chivrac F, Pollet E, Dole P, Avérous L. *Starch-based-nano-biocomposites: Plasticizer impact on the montmorillonite exfoliation process*. Carbohydrate Polymers 79: 941–947 (2010).
- [119] Zhang QX, Yu ZZ, Xie XL, Naito K, Kagawa Y. *Preparation and crystalline morphology of biodegradable starch/clay nanocomposites*. Polymer 48: 7193–7200 (2007).
- [120] Pandey JK, Singh RP. *Green nanocomposites from renewable resources: effect of plasticizers on the structure and material properties of clay-filled starch*. Starch 57: 8–15 (2005).
- [121] Majdzadeh-Ardakani K, Navarchian AH, Sadeghi F. *Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites*. Carbohydrate Polymers 79: 547–554 (2010).
- [122] Iannitelli A, Grande R, Di Stefano A, Di Giulio M, Sozio P, Bessa LJ, Laserra S, Paolini C, Protasi F, Cellini L. *Potential antibacterial activity of carvacrol-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles against microbial biofilm*. International Journal of Molecular Sciences 12: 5039–5051 (2011).
- [123] Stull DR. *Vapor pressure of pure substances – Organic compounds*. Industrial and Engineering Chemistry 39(4): 517–540 (1947).

- [124] Miltz J. *Migration of low molecular weight species from packaging materials: Theoretical and practical considerations*. Gray JI, Harte BR, Miltz J. Food Product-Package Compatibility. Lancaster, Pa.: Technomic Publishing Co. 30-43. (1987).
- [125] Cran MJ, Rupika LAS, Sonneveld K, Miltz J, Bigger W. *Release of naturally derived antimicrobial agents from LDPE films*. Food Engineering and Physical Properties 75(2): 126–133 (2010).
- [126] Grčić I, Vujević D, Koprivanac N. *The use of D-optimal design to model the effects of process parameters on mineralization and discoloration kinetics of Fenton-type oxidation*. Chemical Engineering Journal 157: 408–419 (2010).
- [127] Fang SE, Perera R. *Damage identification by response surface based model updating using D-optimal design*. Mechanical Systems and Signal Processing 25: 717–733 (2011).
- [128] Chung YL, Ansari S, Estevez L, Hayrapetyan S, Giannelis EP, Lai HM. *Preparation and properties of biodegradable starch-clay nanocomposites*. Carbohydrate Polymers 79: 391–396 (2010)..
- [129] Suppakul P, Sonneveld K, Bigger SW, Miltz J. *Loss of AM additives from antimicrobial films during storage*. Journal of Food Engineering 105: 270–276 (2011).
- [130] Chung D, Papadakis SE, Yam KL. *Release of propyl paraben from a polymer coating into water and food simulating solvents for antimicrobial packaging applications*. Journal of Food Processing and Preservation 25: 71–87 (2001).
- [131] Zhang S, Zhao H. *Study on flavonoid migration from active low-density polyethylene film into aqueous food simulant*. Food Chemistry 157: 45–50 (2014).
- [132] Almenar E, Catala R, Hernandez-Muñoz P, Gavara R. *Optimization of an active packaging for wild strawberries based on the release of 2-nonanone*. LWT – Food Science and Technology 42: 587–593 (2009).
- [133] Perkins-Veazie P. *Growth and ripening of strawberry fruit*. En Horticultural Reviews, Volumen 17 (ed. J. Janick), John Wiley & Sons Inc, Oxford, UK (2010).

A. TABLAS

Tabla A.1. ANOVA del modelo obtenido por MLR a partir del primer diseño de experimentos de tipo factorial completo (FFD) para respuesta de distancia interlaminar d_{001} de films de nanocompuestos de PEBD/MOM obtenidos mediante mezclado en estado fundido.

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de p	Desviación estándar
Total corregido	16	7,27148	0,45447			0,67414
Regresión	6	6,68786	1,11464	19,0987	0,000	1,05577
Residual	10	0,58362	0,05836			0,24158
Falta de ajuste (error del modelo)	9	0,45762	0,05085	0,40354	0,850	0,22549
Error puro (error de réplicas)	1	0,12600	0,12600			0,35497

^a grados de libertad.**Tabla A.2.** ANOVA para cada respuesta y del modelo obtenido por PLSR (tras 4 PLS-componentes) para el segundo diseño experimental circunscrito central compuesto (CCC) para la optimización de síntesis de films de nanocompuestos de PEBD/MOM obtenidos mediante mezclado en estado fundido.

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de p	Desviación estándar
<u>y_1 distancia interlaminar d_{001}</u>						
Total corregido	23	24,7559	1,07634			1,03747
Regresión	7	15,1657	2,16652	3,61457	0,016	1,47191
Residual	16	9,59019	0,599387			0,774201
Falta de ajuste (error del modelo)	14	7,73638	0,552599	0,596177	0,778	0,74337
Error puro (error de réplicas)	2	1,85381	0,926904			0,962758
<u>y_2 temperatura de descomposición $T_{0,05}$</u>						
Total corregido	25	193240	7729,6			87,9181
Regresión	7	131834	18833,4	5,52062	0,002	137,235
Residual	18	61406,3	3411,46			58,4077
Falta de ajuste (error del modelo)	16	59035,5	3689,72	3,11261	0,270	60,7431
Error puro (error de réplicas)	2	2370,82	1185,41			34,4298
<u>y_3 temperatura de fusión T_m</u>						
Total corregido	22	4,84375	0,22017			0,469223
Regresión	7	2,94827	0,421181	3,33304	0,024	0,648985
Residual	15	1,89548	0,126366			0,355479
Falta de ajuste (error del modelo)	13	1,59302	0,12254	0,810274	0,677	0,350057
Error puro (error de réplicas)	2	0,302465	0,151233			0,388886
<u>y_4 módulo de Young E</u>						
Total corregido	23	28600	1243,48			35,263
Regresión	7	26860,8	3837,26	35,3022	0,000	61,9456
Residual	16	1739,16	108,697			10,4258
Falta de ajuste (error del modelo)	15	1701,57	113,438	3,01824	0,427	10,6507
Error puro (error de réplicas)	1	37,5843	37,5843			6,1306

y_5 módulo de pérdida G''							
Total corregido	25	13,6797	0,547188				0,739721
Regresión	7	11,2057	1,60082	11,6473	0,000		1,26524
Residual	18	2,47394	0,137441				0,370731
Falta de ajuste (error del modelo)	16	1,27202	0,0795015	0,132291	0,995		0,28196
Error puro (error de réplicas)	2	1,20192	0,600959				0,775216
y_6 módulo de almacenamiento G'							
Total corregido	24	1,50787	0,0628281				0,250655
Regresión	7	1,4291	0,204157	44,0582	0,000		0,451837
Residual	17	0,0787746	0,0046338				0,068072
Falta de ajuste (error del modelo)	16	0,0735421	0,00459638	0,878418	0,698		0,0677966
Error puro (error de réplicas)	1	0,00523256	0,00523256				0,0723365

^a grados de libertad.

Tabla A.3. ANOVA del modelo PLSR (tras 3 PLS-componentes) para cada respuesta del primer diseño de experimentos factorial completo (FFD) para la síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM obtenidos por método de extrusión.

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de p	Desviación estándar
y_1 distancia interlaminar d_{001}						
Total corregido	16	0,092880	0,005805			0,076191
Regresión	5	0,073175	0,014635	8,16939	0,002	0,120975
Residual	11	0,019706	0,001791			0,042325
Falta de ajuste (error del modelo)	10	0,018138	0,001814	1,1572	0,626	0,042589
Error puro (error de réplicas)	1	0,001567	0,001567			0,003959
y_2 temperatura de descomposición $T_{0,10}$						
Total corregido	16	0,063072	0,039420			0,062786
Regresión	5	0,053985	0,010797	13,0692	0,000	0,103908
Residual	11	0,009087	0,000826			0,028743
Falta de ajuste (error del modelo)	9	0,008679	0,000964	4,7219	0,187	0,031054
Error puro (error de réplicas)	2	0,000408	0,000204			0,014291
y_3 módulo de Young E						
Total corregido	15	3,80033	0,253355			0,50334
Regresión	5	3,25907	0,651813	12,0425	0,001	0,80735
Residual	10	0,54126	0,054126			0,23265
Falta de ajuste (error del modelo)	8	0,48833	0,061041	2,30624	0,337	0,24706
Error puro (error de réplicas)	2	0,05294	0,026468			0,16269

^a grados de libertad.

Tabla A.4. ANOVA para el modelo PLSR (tras 4 componentes) para el segundo diseño experimental factorial completo (FFD) de optimización de síntesis de films de bionanocompuestos de ATP/MOM mediante método de extrusión.

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>p</i>	Desviación estándar
<i>y</i> ₁ distancia interlaminar <i>d</i> ₀₀₁						
Total corregido	14	0,015297	0,001093			0,033055
Regresión	9	0,014333	0,001593	8,259	0,016	0,039907
Residual	5	0,000964	0,000193			0,013886
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,000922	0,000307	14,5299	0,065	0,017529
Error puro (error de réplicas)	2	4,229×10 ⁻⁵	2,115×10 ⁻⁵			0,004599
<i>y</i> ₂ temperatura de descomposición <i>T</i> _{0,10}						
Total corregido	14	0,107330	0,007666			0,087558
Regresión	9	0,095658	0,010629	4,55291	0,050	0,103095
Residual	5	0,011672	0,002334			0,048316
Falta de ajuste (error del modelo)	4	0,010778	0,002694	3,01104	0,405	0,051908
Error puro (error de réplicas)	1	0,000895	0,000894			0,029914
<i>y</i> ₃ módulo de Young <i>E</i>						
Total corregido	15	1,25193	0,083462			0,288898
Regresión	9	1,14686	0,127429	7,27714	0,013	0,356973
Residual	6	0,10507	0,017511			0,132329
Falta de ajuste (error del modelo)	4	0,10221	0,025552	17,8917	0,054	0,159851
Error puro (error de réplicas)	2	0,00286	0,001428			0,037791

^a grados de libertad.

Tabla A.5. Registro de radios de crecimiento (en mm) para los ensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento de micelios de *Botrytis cinerea* en PDA tras siete días de contacto con films de nanocompuestos de PEBD/MOM cargados con principios activos derivados de aceites esenciales.

Concentración en film (%m/m)	Carvacrol		Timol	
	Contacto directo	Contacto indirecto	Contacto directo	Contacto indirecto
Control ^a	703,3 ± 30,1 (3) ^b	695,7 ± 7,0 (3)	703,3 ± 30,1 (3)	695,7 ± 7,0 (3)
0,1	638,3 ± 28,6 (3)	646,0 ± 14,0 (3)	665,0 ± 32,9 (3)	681,7 ± 15,0 (3)
0,5	641,0 ± 45,9 (3)	646,0 ± 11,5 (3)	672,3 ± 38,6 (3)	673,0 ± 19,7 (3)
1,0	659,0 ± 36,0 (3)	682,7 ± 35,2 (3)	627,0 ± 43,7 (3)	670,7 ± 25,7 (3)
2,5	364,7 ± 34,7 (3)	486,0 ± 37,4 (3)	196,7 ± 13,4 (3)	262,7 ± 97,8 (3)
5,0	107,0 ± 62,6 (3)	42,3 ± 73,3 (3)	0,0 ± 0,0 (3)	0,0 ± 0,0 (3)
10,0	57,7 ± 56,1 (3)	0,0 ± 0,0 (3)	0,0 ± 0,0 (3)	0,0 ± 0,0 (3)

^a nanocompuesto sin principios activos

^b promedio radio de crecimiento en mm ± desviación estándar (*n*)

Tabla A.6. ANOVA de diseño experimental D-optimal para liberación de carvacrol hacia simulador de alimento a 18 °C desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM por PLSR (tras 7 PLS-componentes).

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de p	Desviación estándar
y_1 velocidad de liberación inicial v_0						
Total corregido	15	0,194824	0,012989			0,113966
Regresión	9	0,181338	0,020148	8,96441	0,007	0,141946
Residual	6	0,013486	0,002248			0,047409
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,011374	0,003791	5,38558	0,100	0,061574
Error puro (error de réplicas)	3	0,002112	0,000704			0,026533
y_2 constante de velocidad cinética total k_1						
Total corregido	15	0,004486	0,000299			0,017229
Regresión	9	0,004085	0,000454	6,78696	0,015	0,021304
Residual	6	0,000401	$6,68 \times 10^{-5}$			0,008177
Falta de ajuste (error del modelo)	2	0,000229	0,000115	2,67354	0,183	0,010713
Error puro (error de réplicas)	4	0,000172	$4,29 \times 10^{-5}$			0,006552
y_3 coeficiente de difusión D						
Total corregido	16	0,058106	0,003631			0,060263
Regresión	9	0,057449	0,006383	68,0312	0,000	0,079895
Residual	7	0,000657	$9,38 \times 10^{-5}$			0,009686
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,000218	$7,26 \times 10^{-5}$	0,66218	0,617	0,008523
Error puro (error de réplicas)	4	0,000439	0,000110			0,010474
y_4 constante de velocidad de difusión k_d						
Total corregido	15	0,072083	0,004806			0,069322
Regresión	9	0,064869	0,007208	5,99485	0,020	0,084898
Residual	6	0,007214	0,001202			0,034674
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,002277	0,000759	0,46113	0,729	0,027548
Error puro (error de réplicas)	3	0,004937	0,001646			0,040567
y_5 temperatura de descomposición $T_{0,10}$						
Total corregido	16	$1,83 \times 10^9$	$1,14 \times 10^8$			10689
Regresión	9	$1,60 \times 10^9$	$1,78 \times 10^8$	5,46208	0,018	13334,2
Residual	7	$2,28 \times 10^8$	$3,26 \times 10^7$			5705,41
Falta de ajuste (error del modelo)	3	$1,79 \times 10^8$	$5,96 \times 10^7$	4,87328	0,080	7722,51
Error puro (error de réplicas)	4	$4,90 \times 10^7$	$1,22 \times 10^7$			3498,23
y_6 módulo de Young E						
Total corregido	17	10711	630,059			25,101
Regresión	9	10248,7	1138,75	19,7079	0,000	33,7454
Residual	8	462,251	57,7814			7,60141
Falta de ajuste (error del modelo)	3	336,939	112,313	4,48135	0,070	10,5978
Error puro (error de réplicas)	5	125,312	25,0623			5,00623
y_7 temperatura de fusión T_m						
Total corregido	15	9,48438	0,63229			0,795168
Regresión	9	8,10623	0,90069	3,92131	0,050	0,949048
Residual	6	1,37815	0,22969			0,479048
Falta de ajuste (error del modelo)	2	0,73314	0,36657	2,27328	0,219	0,605451
Error puro (error de réplicas)	4	0,64501	0,16125			0,401562
y_8 distancia interlaminar d_{001}						
Total corregido	16	1157,32	72,3328			8,50487
Regresión	9	1107,72	123,080	17,3676	0,001	11,0941

Residual	7	49,6073	7,08675			2,66210
Falta de ajuste (error del modelo)	3	39,4455	13,1485	5,17568	0,073	3,62609
Error puro (error de réplicas)	4	10,1618	2,54044			1,59388

^a grados de libertad.

Tabla A.7. ANOVA de diseño experimental D-opimal para la pérdida de carvacrol por volatilización al ambiente a 18 °C desde films de nanocompuestos de PEBD/MOM modelado por PLSR (tras 8 PLS-componentes).

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de <i>F</i>	Valor de <i>p</i>	Desviación estándar
<i>y</i> ₁ ln(C) % carvacrol liberado al 3 ^{er} día						
Total corregido	15	0,192383	0,012825			0,11325
Regresión	9	0,174273	0,019363	6,41529	0,017	0,13915
Residual	6	0,018110	0,003018			0,05494
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,011964	0,003988	1,94695	0,299	0,06315
Error puro (error de réplicas)	3	0,006145	0,002048			0,04526
<i>y</i> ₂ ln(C) % carvacrol liberado al 5 ^o día						
Total corregido	15	0,108826	0,007255			0,08518
Regresión	9	0,101104	0,011234	8,7294	0,008	0,10599
Residual	6	0,007721	0,001287			0,03587
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,004293	0,001431	1,2520	0,429	0,03783
Error puro (error de réplicas)	3	0,003428	0,001143			0,03381
<i>y</i> ₃ ln(C) % carvacrol liberado al 10 ^o día						
Total corregido	13	0,127350	0,009796			0,09898
Regresión	9	0,125341	0,013927	27,7347	0,003	0,11801
Residual	4	0,002009	0,000502			0,02241
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,001995	0,000665	49,1805	0,104	0,02579
Error puro (error de réplicas)	1	1,35×10 ⁻⁵	1,32×10 ⁻⁵			0,00368
<i>y</i> ₄ ln(C) % carvacrol liberado al 45 ^o día						
Total corregido	14	0,396271	0,028305			0,16824
Regresión	9	0,371196	0,041244	8,22427	0,016	0,20309
Residual	5	0,025075	0,005015			0,07082
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,020803	0,006934	3,24702	0,244	0,08327
Error puro (error de réplicas)	2	0,004271	0,002136			0,04621
<i>y</i> ₅ ln(C) % carvacrol liberado al 60 ^o día						
Total corregido	16	0,381149	0,023822			0,15434
Regresión	9	0,337118	0,037458	5,95495	0,014	0,19354
Residual	7	0,044031	0,006290			0,07931
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,009684	0,003228	0,37592	0,776	0,05681
Error puro (error de réplicas)	4	0,034347	0,008587			0,09267
Total corregido	15	2,11×10 ⁹	1,41×10 ⁸			11857,9
Regresión	9	1,98×10 ⁹	2,19×10 ⁸	9,82302	0,006	14814,0
Residual	6	1,34×10 ⁸	2,23×10 ⁷			4726,62
Falta de ajuste (error del modelo)	2	8,55×10 ⁷	4,28×10 ⁷	3,52635	0,131	6539,66
Error puro (error de réplicas)	4	4,85×10 ⁷	1,21×10 ⁷			3482,51

y_7 Módulo de Young E							
Total corregido	17	10711,0	630,059				25,1010
Regresión	9	10510,7	1167,86	46,6492	0,000		34,1739
Residual	8	200,279	25,0349				5,00349
Falta de ajuste (error del modelo)	3	74,9677	24,9892	0,99708	0,466		4,99892
Error puro (error de réplicas)	5	125,312	25,0623				5,00623
y_8 Temperatura de fusión T_m							
Total corregido	16	11,0469	0,69043				0,83092
Regresión	9	9,17872	1,01986	3,82142	0,045		1,00988
Residual	7	1,86816	0,26688				0,51660
Falta de ajuste (error del modelo)	2	0,09032	0,45157	2,33973	0,192		0,67199
Error puro (error de réplicas)	5	0,96501	0,19300				0,43932
y_9 distancia interlaminar d_{001}							
Total corregido	16	1157,32	72,3328				8,50487
Regresión	9	1121,80	124,644	24,5586	0,000		11,1644
Residual	7	35,5277	5,07538				2,25286
Falta de ajuste (error del modelo)	3	25,3659	8,45530	3,32828	0,138		2,90780
Error puro (error de réplicas)	4	10,1618	2,54044				1,59388

^a grados de libertad.

Tabla A.8. ANOVA de diseño experimental D-óptimo para la pérdida de carvacrol por volatilización al ambiente a 18 °C desde films de nanocompuestos de ATP/MOM modelado por PLSR (tras 6 PLS-componentes).

	g.l. ^a	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor de F	Valor de p	Desviación estándar
y_1 módulo de Young E						
Total corregido	17	1,60712	0,09454			0,30747
Regresión	9	1,58815	0,17646	74,4375	0,000	0,42007
Residual	8	0,01896	0,00237			0,04869
Falta de ajuste (error del modelo)	3	0,01099	0,00366	2,29473	0,195	0,06051
Error puro (error de réplicas)	5	0,00798	0,00160			0,03994
y_2 temperatura de descomposición $T_{0,50}$						
Total corregido	16	64810,0	4050,63			63,6445
Regresión	9	63706,1	7078,46	44,8874	0,000	84,1336
Residual	7	1103,86	157,694			12,5576
Falta de ajuste (error del modelo)	3	891,748	297,249	5,60564	0,065	17,2409
Error puro (error de réplicas)	4	212,108	53,0269			7,28196
y_3 tiempo de pérdida $\frac{1}{2}$ de carvacrol $\theta_{1/2}$						
Total corregido	15	187,965	12,5310			3,53991
Regresión	9	175,706	19,5229	9,55566	0,006	4,41847
Residual	6	12,2586	2,04309			1,42937
Falta de ajuste (error del modelo)	2	5,50862	2,75431	1,63220	0,303	1,65961
Error puro (error de réplicas)	4	6,74994	1,68749			1,29903

^a grados de libertad.

Optimization of processing parameters for the synthesis of low-density polyethylene/organically modified montmorillonite nanocomposites using X-ray diffraction with experimental design

Víctor H Campos-Requena,^{a,b} Bernabé L Rivas,^{b*} Mónica A Pérez,^b David Contreras^b and Eduardo Muñoz^c

Abstract

The influence of the processing parameters on the synthesis of low-density polyethylene (LDPE)/organically modified montmorillonite (OMM) nanocomposite films was studied using experimental design. Intercalation in the nanocomposites was analysed using X-ray diffraction and verified using atomic force microscopy. Four direct melt processing parameters were studied to obtain surface maps of intercalation in the nanocomposites: concentration of OMM (clay-%), concentration of Polybond[®] 3149 (compatibilizer-%), mixing temperature (T_{mix}) and mixing time. An ANOVA validated the polynomial function, and intercalation maps from response surface methodology (RSM) were obtained. The clay-% parameter had the most significant effect, and T_{mix} showed no significant effect on intercalation ($p < 0.05$). A strong synergic interaction between clay-% and compatibilizer-% was observed, which is not possible to detect using univariate experiments. RSM provides a powerful tool for choosing the best processing conditions that lead to formulations with the highest intercalations by considering the main factors and their interactions.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: nanocomposites; LDPE; montmorillonite; design of experiments; response surface methodology; processing parameters

INTRODUCTION

Polymer/layered clay nanocomposites have attracted considerable interest in various research fields because of their novel properties. Compared to neat polymers, these materials present dramatic improvements in their physical, mechanical, thermal and permeability properties; for example, they exhibit increased moduli, strength and heat resistance, decreased gas permeability, etc.^{1,2} These hybrid compounds are prepared by incorporating finely dispersed nanolayered silicate materials into a polymer matrix; the particular properties of these compounds are highly dependent on the clay dispersion throughout the polymer matrix.³ Among the organic polymers, low-density polyethylene (LDPE) is widely used in the packaging industry, and therefore the preparation of nanocomposites using this polymer has become a very attractive goal for realizing improved physical properties.⁴ Polymeric compatibilizers that are based on polymers modified with maleic-anhydride are often used with LDPE. Nanocomposite synthesis requires delamination of the clay to create a homogeneous dispersion between the hydrophilic clay and the hydrophobic polymer matrix, which is hard to achieve. The compatibilizer agents increase the affinity between these two phases based on the hydrophilicity of the compatibilizer agent (polyethylene grafted with maleic anhydride) and the chain length of the organic modifier in the clay, so delamination is easier

allowing polymer intercalation into the gallery spaces of silicate creating loops and tails on the clay surface.⁵

Several methods are used for synthesizing polymer/clay nanocomposites. The direct melt processing technique is a versatile process because both the polymer and the silicate are mixed in the molten state in a solvent-free medium. A considerable variety of factors can influence the intercalation, which affects the exfoliation of the clay: (a) interactions between polymer and silicate (type and packing density of polymer, size of the organic modifier in silicates and the use of compatibilizers such maleic anhydride-grafted polyolefins); and (b) processing parameters such as shear device, mixing temperature, shear effect and the residence time in the mixer. These factors play a key role in achieving high levels of intercalation, but intimate interactions

* Correspondence to: Bernabé L Rivas, Faculty of Chemical Sciences, University of Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile. E-mail: brivas@udec.cl

a Faculty of Pharmacy, University of Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

b Faculty of Chemical Sciences, University of Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

c Faculty of Sciences, Institute of Chemistry, Pontifical Catholic University of Valparaíso, Casilla, 4059, Valparaíso, Chile

among these factors lead to complex results and contradictory conclusions in the literature concerning the optimal parameters for achieving high intercalation. Because different processing parameters can affect the intercalation during the synthesis of nanocomposites and because possible interactions among these parameters can occur, establishing optimal conditions for obtaining high intercalation is difficult using theoretical data.⁶ It is generally accepted that completely exfoliated structures have better mechanical properties than intercalated ones, because the complete dispersion of the clay nanolayers in the polymer matrix can enhance a closed contact between these two phases.⁷ Intercalated layered structures in nanocomposites enhance the mechanical and elastic properties, reduce the permeability to gases and improve thermal resistance. This is because of the formation of a tortuous pathway structure that reduces gas transport and improves the reinforcement of the polymer matrix due to the strong interaction between the wide surface area of the clay and the polymer, which facilitates stress transfer to the reinforced phase.⁸

Experimental design is a powerful tool for situations where the relationships between several factors in a process can affect the outcome, it being based on the systematic variation of relevant variables using the fewest possible experiments.⁹ The response surface methodology (RSM) establishes the relationship between a measured response and a variety of factors that influence the outcome.¹⁰ This methodology is useful for modelling and for predicting the behaviour in a system that is influenced by several factors; therefore, the optimal variable settings can be established.¹¹ Few communications have reported multivariate studies of the direct melt technique for nanocomposite synthesis.^{12,13} Experimental design and RSM are useful tools for screening analysis, process optimization and robustness testing, which nowadays are underutilized by polymer scientists. Laboratory synthesis and even industrial processes for polymer synthesis are affected by a large number of factors – each one with their different levels – during the processes, with all the possible combinations needed to be explored. The methodology presented and detailed in this work gives an efficient approach for facing this problem, involving changing all factors simultaneously with a limited number of experiments, which reduces material consumption, time and cost. It also allows the establishment of the optimal conditions for a laboratory- or even industrial-scale process by identifying interactions among the processing factors, which on an industrial scale represents a huge cost when optimization is performed using the COST (change one separate factor at a time) method.

XRD is a mainstream technique for measuring intercalation in nanocomposite structures, monitoring the position and intensity of basal reflections from silicate layers, and for quantifying the level of polymer intercalation in nanoclays. XRD can be complemented with microscopy techniques for qualitative topographic analysis through direct visualization. TEM and SEM are the most commonly used microscopy techniques for analysing nanocomposites; however, atomic force microscopy (AFM) has been attracting considerable attention and has shown good results during the analysis of nanocomposites.^{14,15} The work presented here shows the importance of studying the optimization of processing parameters for nanocomposite synthesis through experimental design using XRD data, which is a relatively easy-access technique that provides a good first approach to determining the mechanical, thermal, rheological and permeability properties of nanocomposites, properties that are closely related to the level

of polymer intercalation through the clay layers. By using XRD for measuring the intercalation and AFM for qualitative confirmation, an experimental design can be optimized to determine the optimal processing conditions for obtaining maximum intercalation during nanocomposite synthesis, which requires a minimal number of experiments and identifies the most important variables and their interactions.

EXPERIMENTAL

Materials

LDPE (density: 0.925 g mL⁻¹ at 25 °C; melt index: 25 g (10 min)⁻¹; melting temperature: 116 °C) was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and used without further treatment. Polybond® 3149 (modified ethylene-co-(maleic anhydride)) was kindly provided by Chemtura (Brazil) and used without further treatment. Organically modified montmorillonite (OMM) Nanomer® 1.44P (montmorillonite clay surface modified with 35–45 wt% dimethyldialkyl (C14–C18) amine) was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and used without further treatment. Technical-grade glycerol was purchased from Sigma-Aldrich (USA).

Preparation of nanocomposites

LDPE/OMM nanocomposites were synthesized by direct melt processing using a Brabender-type twin-screw roller mixer (Proinco). A double-plate compression hot-press (Proinco) was used for producing nanocomposite films. The total mass for each formulation was 30.0 g as a total mixture. Glycerol (2.0 wt%) was used as a demoulding agent. The mixing speed was fixed at 50 rpm as a processing parameter. After blending, the compression moulding temperature used for composite pressing was the same as the mixing temperature used in each experiment.

XRD measurements

To measure the intercalation in the nanocomposites, XRD patterns were recorded with a Bruker AXS D4 Endeavor diffractometer (Germany) using Cu radiation (40 kV, 20 mA) at a scanning speed of 1° min⁻¹ for 2θ between 2° and 30°. The distances between the interlayer spacing (*d*₀₀₁) in the nanocomposites were calculated from the position of the diffraction peak using Bragg's law: $\sin \theta = n\lambda/2d$.

AFM measurements

AFM was performed to analyse the surface topography of the LDPE/OMM nanocomposites. Images were obtained using a Digital Instruments Nanoscope IIIa series employed in Tapping Mode[®] with a scan rate of 0.02 μm s⁻¹, a scan size of 1.5 μm and a z-axis scale of 200 nm per division. Film samples were cut into 1 cm × 1 cm squares and placed onto the scanner of the AFM equipment.

Experimental design

A central composite factorial experimental design was used to study the main processing parameters during the synthesis of the nanocomposite films. The effect of the processing parameters (independent variables), including the concentration of clay (*x*₁), concentration of compatibilizer (*x*₂), mixing temperature (*x*₃) and mixing time (*x*₄), was determined using RSM, which is described elsewhere.^{16,17} These variables and their ranges were selected according to previous screening tests, where variables

such as speed of mixing did not show significant effects on intercalation and mixing temperatures higher than 190 °C did not show significant effects either. The variables were simultaneously changed in a central composite circumscribed design, which consisted of a factorial design and star points. For four variables and two levels (high and low, or +1 and -1), 27 experiments were performed, including 3 central points, to provide statistical consistency to the mathematical model. The ranges used for the variables were *x*₁ from 3.0 to 7.0 wt%, *x*₂ from 4.0 to 12.0 wt%, *x*₃ from 130 to 170 °C and *x*₄ from 7 to 21 min. The central points were fixed at 5.0 wt% for *x*₁, 8.0 wt% for *x*₂, 150 °C for *x*₃ and 14 min for *x*₄ and were determined in triplicate for the variance calculation. All input variables were coded and normalized to unitary values: -1, 0 and +1. The star points at \sqrt{n} (where *n* is the number of variables) from the central point were fixed at 1.0 and 9.0 wt% for *x*₁, 0 and 16.0 wt% for *x*₂, 120 and 190 °C for *x*₃ and 2 and 28 min for *x*₄. The interlayer spacing distances (*d*₀₀₁) of the nanocomposites, which were extracted from the XRD diffractograms, were used as a response factor (*y*). Statistical validation was determined using the ANOVA test at a 95% confidence level. The SIMPLEX method was used for calculating the optimal processing parameters over the response surface. Data analysis, polynomial determination, response surfaces and optimizations were performed using Modde 7.0[®] commercial software.

RESULTS AND DISCUSSION

A shift of the diffraction peaks to lower angles compared to the neat silicate is observed in the XRD analysis, which indicates intercalation in the nanocomposites (Fig. 1). Based on the XRD results of the multivariate experiment, the main factors and their interactions were analysed.

Table 1 describes the experiments performed during the optimization procedure. Real and coded values are shown for all variables. The coded values were obtained by scaling and centring the real values, and were calculated from the difference between the real and centred values (mean) divided by the standard deviation. A total of 27 experiments were performed according to a circumscribed central composite, including 16 factorial design experiments (runs 1–16), 8 star points (runs 17–24) and 3 central points (runs 25–27).

The corresponding polynomial

$$y = 31.325 (\pm 0.335) - 0.641x_1 (\pm 0.166) + 0.173x_2 (\pm 0.166) - 0.083x_3 (\pm 0.172) + 0.249x_4^2 (\pm 0.157) + 0.379x_2^2 (\pm 0.157) + 0.333x_1^2 (\pm 0.178) + 0.467x_1x_2 (\pm 0.207) \quad (1)$$

was obtained using multiple linear regressions. The validity of the polynomial was verified by ANOVA (95% confidence level).

The outcomes (*y*) calculated from this second-order polynomial function show a good correlation with the values from the experimental results. A linear regression plot between the observed values and the predicted values is presented in Fig. 2. A reasonable correlation coefficient, *R* = 0.799, is obtained, which indicates a validated prediction from the calculated equation (*p* < 0.05). The value of *R*_{adj}², which represents the goodness of fit adjusted for degrees of freedom, is 0.489 in the model (*p* < 0.05), being reasonable for the XRD technique. This parameter is less sensitive to the degrees of freedom of the model, and shows

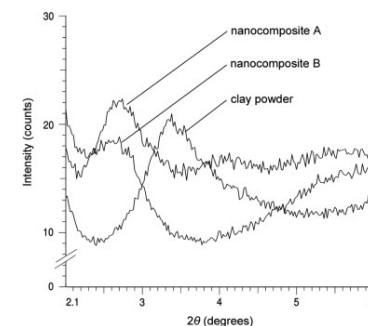


Figure 1. X-ray diffractograms of LDPE/OMM nanocomposites. Nanocomposite A: clay, 3.0 wt%; compatibilizer, 4.0 wt%; 130 °C; 7 min. Nanocomposite B: clay, 3.0 wt%; compatibilizer, 12.0 wt%; 170 °C; 7 min. Clay powder: Nanomer® 1.44P.

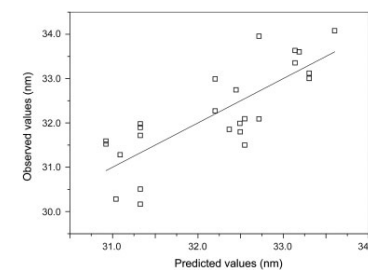


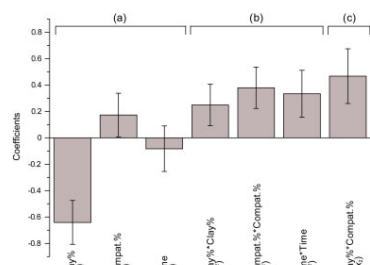
Figure 2. Experimental and predicted values for the interlayer distance in the LDPE/OMM nanocomposites measured using XRD.

no significant variation when coefficients are omitted in order to refine the model, so the value obtained for this polynomial shows a good fit of the model.

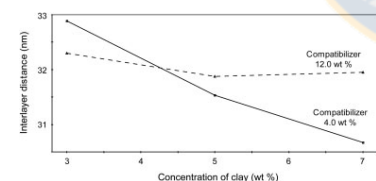
To highlight the importance of each variable, their coefficients in the polynomial are plotted (Fig. 3). Considering the first-order coefficients (*x*_{*n*}) of each variable, it can be concluded that only the concentration of clay (*x*₁) has a significant effect as a processing parameter, which can be observed in Fig. 3(a). This negative value implies that interlayer distance increases when the concentration of clay is decreased. The positive second-order coefficients (*x*_{*n*}²) in Fig. 3(b) indicate a minimum region in the parabola. Figure 3(c) shows that there is a significant synergic interaction between the concentration of clay and the concentration of compatibilizer (*x*₁*x*₂); therefore, they could be considered as non-independent variables. Note that there is no significant term in the polynomial that includes the mixing temperature variable (*x*₃); therefore, this variable was removed from the model.

Table 1. Processing parameters in a factorial design of experiments for the synthesis of LDPE/OMM nanocomposite films

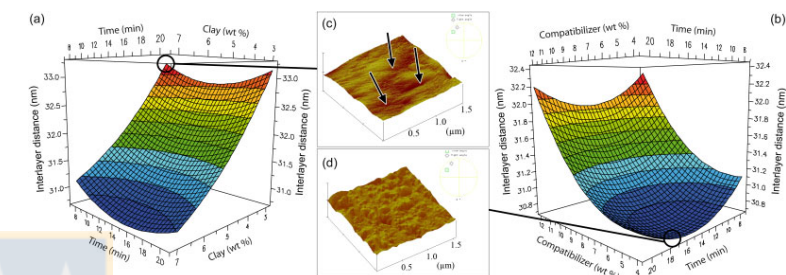
Experiment	x_1 , clay (wt%) ^a	x_2 , compatibilizer (wt%) ^a	x_3 , T_{mix} (°C) ^a	x_4 , time (min) ^a	Experimental XRD results (nm) ^b	Predicted XRD results (nm) ^b
1	3.0 (-)	4.0 (-)	130 (-)	7 (-)	33.12	33.30
2	7.0 (+)	4.0 (-)	130 (-)	7 (-)	— ^c	— ^c
3	3.0 (-)	12.0 (+)	130 (-)	7 (-)	32.08	32.71
4	7.0 (+)	12.0 (+)	130 (-)	7 (-)	— ^c	— ^c
5	3.0 (-)	4.0 (-)	170 (+)	7 (-)	33.00	33.30
6	7.0 (+)	4.0 (-)	170 (+)	7 (-)	31.28	31.09
7	3.0 (-)	12.0 (+)	170 (+)	7 (-)	33.96	32.72
8	7.0 (+)	12.0 (+)	170 (+)	7 (-)	31.86	32.37
9	3.0 (-)	4.0 (-)	130 (-)	21 (+)	33.35	33.14
10	7.0 (+)	4.0 (-)	130 (-)	21 (+)	30.92	30.92
11	3.0 (-)	12.0 (+)	130 (-)	21 (+)	32.09	32.55
12	7.0 (+)	12.0 (+)	130 (-)	21 (+)	32.99	32.20
13	3.0 (-)	4.0 (-)	170 (+)	21 (+)	33.63	33.14
14	7.0 (+)	4.0 (-)	170 (+)	21 (+)	31.52	30.92
15	3.0 (-)	12.0 (+)	170 (+)	21 (+)	31.50	32.55
16	7.0 (+)	12.0 (+)	170 (+)	21 (+)	32.27	32.20
17	1.0 (-2)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	34.08	33.60
18	9.0 (+2)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	30.28	31.04
19	5.0 (0)	0 (-2)	150 (0)	14 (0)	31.80	32.50
20	5.0 (0)	16.0 (+2)	150 (0)	14 (0)	33.60	33.19
21	5.0 (0)	8.0 (0)	120 (-2)	14 (0)	31.90	31.32
22	5.0 (0)	8.0 (0)	190 (+2)	14 (0)	31.72	31.32
23	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	2 (-2)	32.75	32.45
24	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	28 (+2)	31.99	32.49
25	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	30.17	31.32
26	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	30.51	31.32
27	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	31.98	31.32

^a Coded values for variables are shown in parentheses.^b Distances between interlayer spacing (d_{001}) in nanocomposites.^c Not detected.**Figure 3.** Plot of polynomial coefficient response with coded values and standard deviation error bars.

The interaction between the clay concentration and the compatibilizer agent concentration (x_1, x_2) is plotted in Fig. 4, and it is seen that the plotted lines intersect. If a low concentration of clay is used in the nanocomposite formulation, low concentrations of compatibilizer increase the interlayer distance; however, at higher concentrations of clay, higher interlayer distances are achieved using higher concentrations of compatibilizer agent

**Figure 4.** Plot of the interaction between the concentration of clay and the concentration of compatibilizer (x_1, x_2) for the synthesis of LDPE/OMM nanocomposites.

in the formulations. The meaning of this interaction is that similar concentrations of clay and compatibilizer agent must be used in the formulation to keep a proportion of masses that allows efficient delamination of the clay. If a small quantity of compatibilizer agent is added with a large quantity of clay, no separation of layers is achieved and the LDPE matrix has less space to intercalate the clay. On the other hand, if the concentration of compatibilizer agent is large and a low concentration of clay is used, a saturation of compatibilizer on the layers could occur, and no space for LDPE is left, diminishing the intercalation of the polymer matrix.

**Figure 5.** Response surface plots for the interlayer distance in LDPE/OMM nanocomposites determined using XRD: (a) clay-% versus time plot with the concentration of compatibilizer = 4.0 wt%; (b) compatibilizer-% versus time plot with the concentration of clay = 7.0 wt%. (c, d) AFM images (1.5 $\mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$) of the LDPE/OMM nanocomposites.

After obtaining the response surface map for the processing parameters, the outcome values for achieving maximum intercalations were determined. The optimal processing conditions that achieve maximum interlayer distance values are clay-% = 3.0 wt%, compatibilizer-% = 4.0 wt% and time = 7 min (black circle in Fig. 5(a)) which result in a predicted spacing (d_{001}) value of 33.30 nm according to the model, compared with 33.12 and 33.00 nm for the actual spacing (d_{001}) values obtained from XRD (experiments 1 and 5 with the same conditions in Table 1). There is a significant difference with central points of the experiment, clay-% = 5.0 wt%, compatibilizer-% = 8.0 wt%, T_{mix} = 150 °C and time = 14 min, that have a predicted response of 31.32 nm for the interlayer distance, which demonstrates the strong effects of the chosen variables in the study.

AFM analysis shows a smooth surface and platelet-type structures of approximately 0.5 μm observed in Fig. 5(c), which indicates a high degree of intercalation that can be confirmed from quantitative XRD results for this formulation that is located at the top of the parabola, the zone with highest intercalations according to XRD analysis (black circle in Fig. 5(a)). The arrows in the AFM image (Fig. 5(c)) show the layer-type distribution of the nanocomposite surface, which indicates that the clay adopts a parallel orientation through the polymeric matrix, so a soft topography is observed. The image shown in Fig. 5(d) corresponds to the surface morphology of a nanocomposite with the lowest interlayer distance according to XRD analysis. A lack of a platelet-type structure and an increase in roughness are observed, which can be attributed to a poorly intercalated nanocomposite formulation, which occurs at the parabola minimum (black circle in Fig. 5(b)).

CONCLUSIONS

The intercalation of LDPE/OMM nanocomposite films that were synthesized using direct melt processing was determined with XRD and AFM using experimental design. The concentration of clay and the mixing time are variables that have a negative dependence on intercalation, and the concentration of compatibilizer has a positive dependence on the response. The mixing temperature has no significant effect on the intercalation. A strong synergic interaction between the concentration of clay

and the concentration of compatibilizer agent is observed. The RSM becomes a powerful tool for nanocomposite synthesis to set optimal processing conditions and to achieve high intercalation. The optimal processing parameters that achieve maximum intercalation values are: clay = 3.0 wt%, compatibilizer = 4.0 wt% and time = 7 min. Additionally, the AFM technique can be a useful tool for monitoring the degree of intercalation in nanocomposites, which allows additional information to be obtained that can be used for controlling and confirming the final morphology and texture of the nanocomposites. Experimental design can be useful when setting different processing conditions that need to be tested – e.g. when thermosensitive materials or drugs are added into the nanocomposite formulation – and the outcome values are already known from the information provided by the response surface maps.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FONDEC (grant no. D0101234) and CIPA (Centro de Investigación de Polímeros Avanzados). VHC-R gratefully thanks CONICYT-Chile for its financial support through Doctoral Thesis Support Grant 24110010 and Doctoral Studies in Chile Support Grant 21090205; Red Universitaria Cruz del Sur Grant for financial support of the AFM analysis, and also thanks to Mónica Uribe from GEA-UdeC for help with the XRD analysis.

REFERENCES

- Sinha-Ray S and Okamoto M, *Prog Polym Sci* **28**:1539–1641 (2003).
- Pavlidou S and Papispyrides CD, *Prog Polym Sci* **33**:1119–1198 (2008).
- Pérez MA, Rivas BL, Rodríguez SM, Maldonado A and Venegas C, *J Chil Chem Soc* **55**:440–444 (2010).
- Morawiec J, Pawlak A, Slouf M, Galeski A, Piorkowska E and Krasnikowa N, *Eur Polym J* **41**:1115–1122 (2005).
- Tjong SC, *Mater Sci Eng R* **53**:73–197 (2006).
- Paul DR and Robeson LM, *Polymer* **49**:3187–3204 (2008).
- Chin J, Thurn-Albrecht T, Kim HC, Russell TP and Wang J, *Polymer* **42**:5947–5952 (2001).
- Malucelli G, Ronchetti S, Lak N, Priola A, Tzankova-Dintcheva N and La Mantia FP, *Eur Polym J* **43**:328–335 (2007).
- Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-World N, Wikström C and World S, *Design of Experiments: Principles and Applications*, 3rd edition. Umetrics, Stockholm (2000).

- 10 de Barros Neto B, Scarmínio IS and Bruns RE. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. UNICAMP, Campinas, Brazil (2001).
- 11 Brereton RG. *Applied Chemometrics for Scientists*. Wiley, Chichester (2007).
- 12 Yong V and Hahn HT. *Nanotechnology* **16**:354–360 (2005).
- 13 Chow WS and Yap YP. *Express Polym Lett* **2**:2–11 (2008).
- 14 Ataefard M and Moradian S. *Appl Surf Sci* **257**:2320–2326 (2011).
- 15 Chow WS, Mohd Ishak ZA and Karger-Kocsis J. *J Polym Sci B: Polym Phys* **43**:1198–1204 (2005).
- 16 Contreras D, Moreno Y, Salgado Y, Cárdenas G, Baggio R, Peña O et al., *New J Chem* **31**:1751–1754 (2007).
- 17 Tsimpliaraki A, Zuburtikudis I, Marras SI and Panayiotou C. *Polym Int* **60**:859–871 (2011).



Application of design of experiments, response surface methodology and partial least squares regression on nanocomposites synthesis

Víctor H. Campos-Requena · Bernabé L. Rivas ·
Mónica A. Pérez · Manfred Wilhelm

Received: 14 November 2013 / Revised: 12 February 2014 / Accepted: 15 April 2014 /
Published online: 26 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract We present an integral chemometric treatment for characterization and synthesis of low-density poly(ethylene)/organically modified montmorillonite nanocomposites using direct melt processing method, complementing design of experiment (DOE), response surface methodology (RSM) and partial least squares (PLS) regression. A central composite circumscribed DOE was used to study the influence of four processing parameters—concentration of clay (Clay%), concentration of compatibilizer (Comp%), mixing temperature (T_{mix}) and mixing time (t_{mix})—on six nanocomposites properties: interlayer distance, decomposition temperature, melting temperature, Young's modulus, loss modulus and storage modulus. PLS-regression was used to simultaneously correlate parameters and responses. RSM was used to explore interactions among parameters and predict nanocomposite properties on the experimental region. The six responses were simultaneously PLS-modeled with $R^2 = 0.768$ ($p \leq 0.05$) being Clay% and Comp% the most important parameters and t_{mix} the least influential. Moreover, significant ($p \leq 0.05$) and complex interactions among Clay%, Comp% and t_{mix} were found. A complementary interpretation of score and loading plots, coefficient plots, variable importance plots and response surface plots are explained to show how to find the optimal combination of processing parameters according the desired nanocomposite properties.

V. H. Campos-Requena
Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

V. H. Campos-Requena · B. L. Rivas (✉) · M. A. Pérez
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile
e-mail: brivas@udec.cl

M. Wilhelm
Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology
(KIT), Engesserstraße 18, 76128 Karlsruhe, Germany

Keywords Nanocomposites · Processing parameters · Direct melt processing · Design of experiments · Response surface methodology · Partial least squares regression

Introduction

Polymer/nanoclay nanocomposites offer several advantages both technological and economical related to classical polymers. Enhanced barrier properties, thermal/mechanical resistance and rheological properties of neat polymers have been improved with the addition of low quantities of nanoclays onto the organic matrix [1]. Among the polymers used on nanocomposite synthesis, polyethylene is one of the most used nowadays, which has been applied on different technological and industrial fields like food and pharmaceutical packaging, garbage bags, agricultural films and merchandising packaging among many other uses [2, 3]. Hydrophobic non-polar polymers, like polyethylene or polypropylene have a weak interaction with hydrophilic polar clays, so maleic anhydride-grafted polymers have been used as “compatibilizers” to improve the affinity between polymer matrix and inorganic clay, and consequently reaching high intercalated levels which provide the mentioned novel properties on nanocomposites [4–7].

One of the most used methods for nanocomposite synthesis is the direct melt processing method because of its low cost and free-solvent performance [8]. In direct melt processing method, many variables can influence the final nanocomposite characteristics. These include (a) the chemical variables like affinity and interactions between both organic and inorganic matrices; (b) the processing parameters variables like mixing time, mixing temperature, mixing speed, proportion of polymer/clay and so on. All these variables influence in a very complex way the nanocomposite final properties after the synthesis [9]. Many publications have been reported for organic polymer nanocomposites synthesis, providing complex and contradictory conclusions regarding the optimal processing conditions for their synthesis. Most of these works use univariable experiments and compare different synthesis conditions assuming that all processing conditions involved on the synthesis behave independently with respect to others, and considering that no interactions among variables are present [10, 11]. Moreover, for a complete characterization of nanocomposites, several types of responses (mechanical, morphological, rheological, thermal, etc.) must be measured, and a correct interpretation of the synthesis process must include a deep and detailed analysis of the relationships between variables and responses simultaneously, so the synthesis process must be understood as a complex set of experimental data.

In situations where the relationships among several variables in a process can affect the final outcome, design of experiments (DOE) is the appropriated choice. DOE is based on the systematic variation of the variables by changing all of them simultaneously in a multivariable way performing a limited number of experiments, so material consumption is reduced, cost of experimental work is decreased and experimental time is saved [12, 13]. Response surface methodology (RSM) is a collection of mathematical and statistical techniques based on the fit of a polynomial

equation to the experimental data, and becomes a powerful tool for describing the studied system, so predictions of its behavior can be made by creating surface response plots that represent the system under the studied region [14–16].

One classical data-analytical problem on polymer sciences is how to model one or several responses by means of a set of variables, e.g., properties of polymers and processing conditions on their manufacture. Partial least squares (PLS) regression (also known as projections to latent structures) is a relatively recent multivariate regression method that combines aspects from principal component regression (PCR) and multiple linear regression (MLR). PLS-regression is a pertinent statistical choice when (a) there are many variables x that are correlated with many responses y , and (b) there is missing data on the experimental work. PLS has two primary objectives: approximate variables x and responses y , and to model the relationship between both. When many responses y have been measured in an experiment, it is useful to fit a model simultaneously representing the variation of all responses y to the variation of all variables x to find their relationships, and giving a simple overall picture instead of model each response y separately. PLS compresses the variables and finds new linear combinations (PLS-components) of the original variables and responses, and uses only these few relevant PLS-components of the variation in the regression [17].

Chemometric tools like DOE, RSM, PCR or PLS-regression are well applied and described on spectroscopy [18–20] and analytical field [21, 22], but there are few reports of practical application on the polymer area [23, 24]. Application of DOE and RSM to face synthesis processes, and the use of PLS-regression for simultaneous complex data calibration are perhaps underutilized nowadays among polymer engineers and scientists. These methodologies can be helpful when many variables and many responses are present on chemical processes—like polymer or nanocomposite synthesis—and correlation among them must be carried out. The here presented work contributes to divulge and is intended to explain in a schematic and summarized way the integral and practical use of these chemometric tools on nanocomposites synthesis but directed to polymer scientists and engineers.

Experimental

Materials

Low-density polyethylene (density 0.925 g mL^{-1} at $25 \text{ }^\circ\text{C}$, melt index 25 g/10 min ($190 \text{ }^\circ\text{C}/2.16 \text{ kg}$), melting temperature $116 \text{ }^\circ\text{C}$) was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and used without further treatment. Polybond[®] 3149 (modified ethylene-*co*-maleic anhydride) was used as compatibilizer agent and was kindly provided by Chemtura (Brazil) and used without further treatment. Organically modified montmorillonite Nanomer[®] I.44P (montmorillonite clay surface modified with 35–45 wt% dimethyl dialkyl (C14–C18) amine) was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and used without further treatment. Glycerol technical grade was purchased on Sigma-Aldrich (USA) and used as demolding agent.

Nanocomposite films synthesis

Low-density polyethylene/organically modified montmorillonite (LDPE/OMM) nanocomposite films were synthesized by direct melt processing method using a Brabender-type twin-screw roller mixer (Proinco). Total mass for each formulation was 30.0 g. Constant glycerol 2.0 wt% was used as demolding agent on the formulations. Speed of mixing was fixed at 50 rpm. After blending, the nanocomposites were hot pressed at the same synthesis mixing temperature condition with double plate compression hot-press (Proinco) until a thickness film of 1.5 mm. A dog-bone shaped die with gauge length of 10 mm was used.

Nanocomposite films analysis

Thermal properties of nanocomposite films were determined by differential scanning calorimetry (DSC) using a DSC30 Calorimeter (Mettler, USA), and thermogravimetric analysis (TGA) using a TG209 F1, Netzsch (Germany). Melting temperature (T_m) was determined by heating 10–15 mg of film sample under N_2 atmosphere (gas flow rate 20.0 mL min^{-1}) from 25 to $200 \text{ }^\circ\text{C}$ at the rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, cooling down at the rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, and heating again at the rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ from 25 to $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Decomposition temperature ($T_{0.05}$) on 10 mg of film sample was studied in the range between 20 and $600 \text{ }^\circ\text{C}$, with a heating rate of $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ in air. Rheological measurements loss modulus (G'') and storage modulus (G') were determined in an ARES classical rheometer (TA Instruments, USA) equipped with parallel plate geometry with 8-mm plate diameter and gap of 1.0 mm. Measurements were performed at $160 \text{ }^\circ\text{C}$ under N_2 atmosphere (gas flow rate 25.0 L min^{-1}) in a dynamic frequency of 0.5 Hz, in a strain amplitude of 4 % to ensure that the measurements were performed in the linear rheological regime. Young's modulus (E) measurements were performed by ASTM D638 method with a rate of stretching of 1.5 mm min^{-1} , and were conducted at room temperature using a GABO Eplexor Qualimeter (Germany), and all measurements were performed in triplicate. X-ray diffraction measurements were performed in a Bruker AXS D4 Endeavor diffractometer (Germany) using Cu radiation (40 kV, 20 mA) with a scanning speed of 1° min^{-1} between 2° and $30^\circ 2\theta$. Interlayer spacing distances (d_{001}) in nanocomposite films were calculated from the diffraction peak using Bragg's Law: $\sin\theta = n\lambda/2d$.

Design of experiments (DOE)

Processing parameters for direct melt processing synthesis of LDPE/OMM nanocomposite films were studied performing a central composite circumscribed experiment design. Four processing parameters (variables x) were evaluated: x_1 concentration of clay (Clay%), x_2 concentration of compatibilizer (Comp%), x_3 mixing temperature (T_{mix}) and x_4 mixing time (t_{mix}). The design consisted of two levels and star points with a total of 27 experiments, including three central points, which were carried out in a random way. Corner points, central points and star points used on the design are detailed in Table 1. Central points were determined in

Table 1 Central composite circumscribed design of experiments describing the four studied variables x for LDPE/OMM nanocomposite films synthesis

	x_1 Clay% (wt%)	x_2 Compatibilizer% (wt%)	x_3 Mixing temperature ($^\circ\text{C}$)	x_4 Mixing time (min)
Central points (0) ^a	5.0	8.0	150	14
Corner points (−1/1)	3.0/7.0	4.0/12.0	130/170	7/21
Star points (−2/2)	1.0/9.0	0/16.0	120/190	2/28

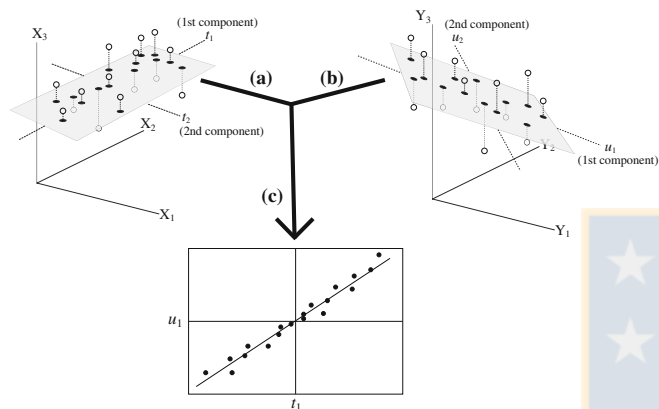
^a Values in parenthesis are the coded variable levels: −2, low star point level; −1, low corner level; 0, central level; 1, high corner level; 2, high star point level

triplicate for variance calculation. All the input variables were coded and normalized to its unitary values (−1, 0, +1) for their respective levels, and stars points were set at \sqrt{n} (n = number of evaluated variables) from the central points (see Table 1). Six different responses (y) were measured: interlayer distance d_{001} (y_1), decomposition temperature $T_{0.05}$ (y_2), melting temperature T_m (y_3), Young's modulus E (y_4), loss modulus G'' (y_5) and storage modulus G' (y_6). MODDE 7.0[®] software (Umetrics, Sweden) was employed for all calculations.

Partial least squares (PLS) regression and response surface methodology (RSM)

For the analysis of x -variables and y -responses relationships at the same time as a unique set of data, PLS-regression was performed using the experimental data (experimental runs in DOE). PLS-regression analysis was ANOVA validated, and for obtaining fairly symmetrical distribution of the y response data and bring a close to the normal distribution, mathematical transformation on some responses were carried out, including logarithmic, linear, and power transformations, so the efficiency of the data analysis was improved, enhancing model validity and inferential reliability.

As Scheme 1a shows, PLS-regression method creates new variables called x -scores denoted by t_a (a = number of PLS-components) as weighted combinations of the original x variables. The y responses are similarly weighted combined to a new y -scores denoted by u_a (a = number of PLS-components) as shown on Scheme 1b. These PLS-components are few, often from 2 to 4, independent (orthogonal), and they are used to model the responses. PLS model consists of a simultaneous projection of both x variables and y responses on a dimensional hyper plane with these new coordinates t (summarizing x) and u (summarizing y), and then relating u to t with the objective of maximizing the correlation between x variables and y responses as shown on Scheme 1c [25, 26]. When data set is PLS-modeled, these few PLS-components obtained offer the possibility to visually inspect the correlation structure between the variables and the responses through score plots and loading plots. In the score plots, linear summaries of x and y are plotted (u and t , respectively), plotting each experiment in the design. They contain information about the experimental runs, their similarities and dissimilarities and outlier experiments. On the other hand, loading plots allow to overview the relationship between variables and responses through new



Scheme 1 Geometrical representation of PLS-regression. *a* Projections (black circles) of the new variables *t* from *x* variables space on a new PLS-component. The number of *x*-axes is the number of *x* variables of the experiment. *b* Projections of the new variables *u* from *y* responses space on a new PLS-component. The number of *y*-axes is the number of measured *y* responses on the experiment. *c* Plot relating new coordinates *t* and *u*

x- and *y*-weights (w_a and c_a) of one PLS-component against another, plotting all the variables and all the responses at the same time and showing their relationships. Mathematical and geometrical technical description of PLS method is described elsewhere [17, 26]. For overview the fitted model, RSM was used for analyzing the surface maps for the different responses and detect of interactions among variables and quadratic models present on the responses. An ANOVA test was carried out for statistical validation of all regressions at 95 % confidence level. PLS model was calculated using PLS2 NIPALS algorithm. MODDE 7.0[®] software (Umetrics, Sweden) was used for all calculations.

Results and discussion

The set of 27 experiments constructed by DOE is presented in Table 2 detailing the data obtained for the six experimental measured responses *y*. Despite the presence of missing data on the response matrix, PLS has the advantage of handling efficiently this missing data problem (maximum 10 % of missing data), in contrast with multiple lineal regression [26].

PLS model interpretation

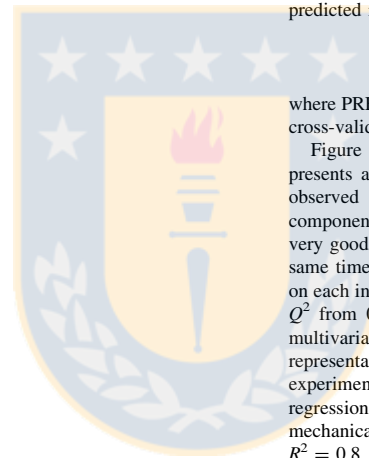
For PLS model fitness evaluation, explained variation and predicted variation was examined. The explained variation is expressed by R^2 (goodness of the model),

Table 2 Experiment data of the factorial design of experiments for direct melt processing synthesis of LDPE/OMM nanocomposites films, including variables *x* and responses *y*

Exp ^a	<i>x</i> ₁ Clay% (wt%)	<i>x</i> ₂ Comp% (wt%)	<i>x</i> ₃ <i>T</i> _{max} (°C)	<i>x</i> ₄ <i>t</i> _{max} (mm)	<i>y</i> ₁ <i>d</i> ₉₀₁ (nm)	<i>y</i> ₂ <i>T</i> _{0.05} (°C)	<i>y</i> ₃ <i>T</i> _m (°C)	<i>y</i> ₄ <i>E</i> (MPa)	<i>y</i> ₅ <i>G</i> ^o (Pa)	<i>y</i> ₆ <i>G</i> ^o (Pa)
1	3.0 (-1) ^b	4.0 (-1)	130 (-1)	7 (-1)	33.121	377.99	112.19	394.88	2,697.6	1,231.5
2	7.0 (+1)	4.0 (-1)	130 (-1)	7 (-1)	–	306.95	113.14	457.83	3,885.6	2,620.4
3	3.0 (-1)	12.0 (+1)	130 (-1)	7 (-1)	32.089	414.75	112.27	460.40	5,729.6	3,780.0
4	7.0 (+1)	12.0 (+1)	130 (-1)	7 (-1)	–	248.03	112.72	474.16	4,856.6	4,395.7
5	3.0 (-1)	4.0 (-1)	170 (+1)	7 (-1)	33.002	376.01	112.35	432.57	2,531.1	1,150.4
6	7.0 (+1)	4.0 (-1)	170 (+1)	7 (-1)	31.281	321.83	–	464.49	5,070.1	2,914.5
7	3.0 (-1)	12.0 (+1)	170 (+1)	7 (-1)	–	391.19	112.32	474.56	5,788.7	3,711.7
8	7.0 (+1)	12.0 (+1)	170 (+1)	7 (-1)	31.855	333.77	–	–	8,390.7	7,298.1
9	3.0 (-1)	4.0 (-1)	130 (-1)	21 (+1)	33.353	323.26	–	420.82	3,335.2	1,574.7
10	7.0 (+1)	4.0 (-1)	130 (-1)	21 (+1)	31.590	350.02	113.06	478.16	3,583.8	2,337.2
11	3.0 (-1)	12.0 (+1)	130 (-1)	21 (+1)	32.093	383.75	112.56	471.47	4,425.8	3,142.9
12	7.0 (+1)	12.0 (+1)	130 (-1)	21 (+1)	32.991	297.92	112.83	508.19	6,716.0	6,089.0
13	3.0 (-1)	4.0 (-1)	170 (+1)	21 (+1)	33.633	381.56	111.73	440.14	4,109.0	1,740.5
14	7.0 (+1)	4.0 (-1)	170 (+1)	21 (+1)	31.523	341.83	112.47	494.91	5,196.0	2,824.2
15	3.0 (-1)	12.0 (+1)	170 (+1)	21 (+1)	31.501	390.37	112.04	497.45	6,287.2	4,123.4
16	7.0 (+1)	12.0 (+1)	170 (+1)	21 (+1)	32.271	377.02	112.65	547.57	8,310.0	7,595.6
17	1.0 (-2)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	34.079	414.19	112.28	438.32	3,078.7	1,478.0
18	9.0 (+2)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	30.280	–	–	509.64	6,480.0	6,011.2
19	5.0 (0)	0 (-2)	150 (0)	14 (0)	31.798	405.13	112.43	–	3,510.5	1,415.9
20	5.0 (0)	16.0 (+2)	150 (0)	14 (0)	33.602	406.61	113.58	523.90	9,381.9	9,374.4
21	5.0 (0)	8.0 (0)	120 (-2)	14 (0)	31.897	307.66	112.51	448.06	4,414.0	2,816.0
22	5.0 (0)	8.0 (0)	190 (+2)	14 (0)	31.715	420.84	112.34	504.87	5,702.2	3,356.4
23	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	2 (-2)	32.745	308.28	112.95	444.62	–	–

Table 2 continued

Exp ^a	x ₁ Clay% (wt%)	x ₂ Comp% (wt%)	x ₃ T _{max} (°C)	x ₄ t _{mix} (min)	y ₁ d ₉₀₁ (nm)	y ₂ T _{0.05} (°C)	y ₃ T _m (°C)	y ₄ E (MPa)	y ₅ G' (Pa)	y ₆ G'' (Pa)
24	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	28 (+2)	31.989	388.78	111.69	492.67	3.858.8	2,633.4
25	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	30.166	325.47	112.51	–	3,337.3	2,192.2
26	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	30.505	343.91	113.14	456.36	6,820.5	–
27	5.0 (0)	8.0 (0)	150 (0)	14 (0)	31.977	359.87	113.22	447.69	4,023.3	2,774.4

^a Experiments on the design^b Codified values for variables are shown in parenthesis^c Missing data or outlier data

which is the fraction of the total variation of the response that is explained in the model, calculated as:

$$R^2 = \frac{(SS - SS_{\text{resid}})}{SS}, \quad (1)$$

where SS is the sum of squares of the total variation of a given response, corrected for the average, and SS_{resid} is the amount of variation that cannot be modeled, due to the residuals (see Eq. 1). The predicted variation is expressed by Q^2 (goodness of prediction), which is the fraction of the total variation of the response that can be predicted in the model, calculated as:

$$Q^2 = \frac{(SS - \text{PRESS})}{SS}, \quad (2)$$

where PRESS is the prediction residual sum of squares which is determined through cross-validation (see Eq. 2).

Figure 1a shows that after four PLS-components the overall regression model presents a $R^2 = 0.768$ and a $Q^2 = 0.501$, and no improvement on the model is observed at higher PLS-components, so the model with the first four PLS-components are sufficient to describe the data variance. The R^2 and Q^2 values show a very good correlation considering that six different responses were modeled at the same time ($p \leq 0.05$). Figure 1b shows individual R^2 values for regression model on each individual response, with a range of R^2 from 0.610 to 0.946, and a range of Q^2 from 0.200 to 0.778 ($p \leq 0.05$), which give us a strong indication that the multivariate model is well found and warranted. Figure 2 shows a visual representation of PLS fitted R^2 for each response, by plotting measured experimental data response vs. predicted values for response according the PLS-regression model. A good correlation can be observed for rheological and mechanical responses (see Fig. 2d–f) showing a goodness of model higher than $R^2 = 0.8$. In the case of thermal and morphological responses (see Fig. 2a–c) the goodness of model is slightly lower and more scattered plots are observed, but goodness of model are over $R^2 = 0.6$ on all responses. These R^2 values reflect a satisfactory goodness of model for each response considering that six different

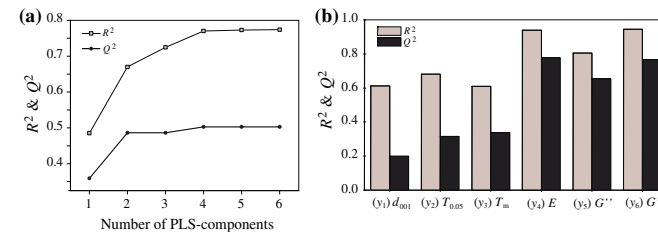


Fig. 1 PLS-regression of the experiment: a summary of fit per PLS-component; b summary of fit per individual response after four PLS-components

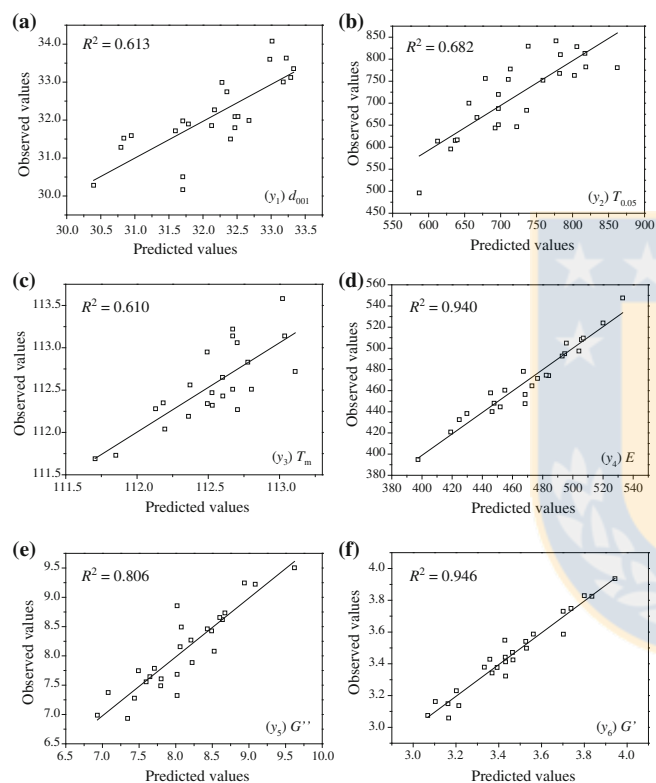


Fig. 2 Experimental data vs. predicted values plots for each response fitted by PLS-regression. **a** y_1 interlayer distance d_{001} ; **b** y_2 decomposition temperature $T_{0.05}$ with linear $2y$ data transformation; **c** y_3 melting temperature T_m ; **d** y_4 Young's modulus E ; **e** y_5 loss modulus G'' with power $y^{0.25}$ data transformation; and **f** y_6 storage modulus G' with logarithmic data transformation

responses have been modeled simultaneously. For estimation of significance of the PLS model, an analysis of variance (ANOVA) was applied with a 0.05 significance probability. The ANOVA for each response is detailed on Table 3.

The correlation structure between variables x and responses y can be visually inspected on score plots. Figure 3a provides a scatter plot of the first pair of scores (first and second PLS-components) represented by the first linear summary of x -scores and y -response (u_1 and t_1), where each plot point depicts one experiment on

Table 3 ANOVA table for measured responses on the PLS model

	d.f.	Sum square	Mean square	F value	p value	SD
y_1 interlayer distance d_{001}						
Total corrected	23	24.7559	1.07634			1.03747
Regression	7	15.1657	2.16652	3.61457	0.016	1.47191
Residual	16	9.59019	0.599387			0.774201
Lack of fit (model error)	14	7.73638	0.552599	0.596177	0.778	0.74337
Pure error (replicate error)	2	1.85381	0.926904			0.962758
y_2 decomposition temperature $T_{0.05}$						
Total corrected	25	193,240	7,729.6			87.9181
Regression	7	131,834	18,833.4	5.52062	0.002	137.235
Residual	18	61,406.3	3,411.46			58.4077
Lack of fit (model error)	16	59,035.5	3,689.72	3.11261	0.270	60.7431
Pure error (replicate error)	2	2,370.82	1,185.41			34.4298
y_3 melting temperature T_m						
Total corrected	22	4.84375	0.22017			0.469223
Regression	7	2.94827	0.421181	3.33304	0.024	0.648985
Residual	15	1.89548	0.126366			0.355479
Lack of fit (model error)	13	1.59302	0.12254	0.810274	0.677	0.350057
Pure error (replicate error)	2	0.302465	0.151233			0.388886
y_4 Young's modulus E						
Total corrected	23	28.600	1,243.48			35.263
Regression	7	26,860.8	3,837.26	35.3022	0.000	61.9456
Residual	16	1,739.16	108.697			10.4258
Lack of fit (model error)	15	1,701.57	113.438	3.01824	0.427	10.6507
Pure error (replicate error)	1	37.5843	37.5843			6.1306
y_5 loss modulus G''						
Total corrected	25	13.6797	0.547188			0.739721
Regression	7	11.2057	1.60082	11.6473	0.000	1.26524
Residual	18	2.47394	0.137441			0.370731
Lack of fit (model error)	16	1.27202	0.0795015	0.132291	0.995	0.28196
Pure error (replicate error)	2	1.20192	0.600959			0.775216
y_6 storage modulus G'						
Total corrected	24	1.50787	0.0628281			0.250655
Regression	7	1.4291	0.204157	44.0582	0.000	0.451837
Residual	17	0.0787746	0.0046338			0.068072
Lack of fit (model error)	16	0.0735421	0.00459638	0.878418	0.698	0.0677966
Pure error (replicate error)	1	0.00523256	0.00523256			0.0723365

the design. A very good correlation between variables x and responses y is shown because all samples would line up on a diagonal line from corner to corner and passing by the origin plot. In contrast, the weaker the correlation the more scattered the experiments around this imaginary diagonal [27, 28]. This indicates that the

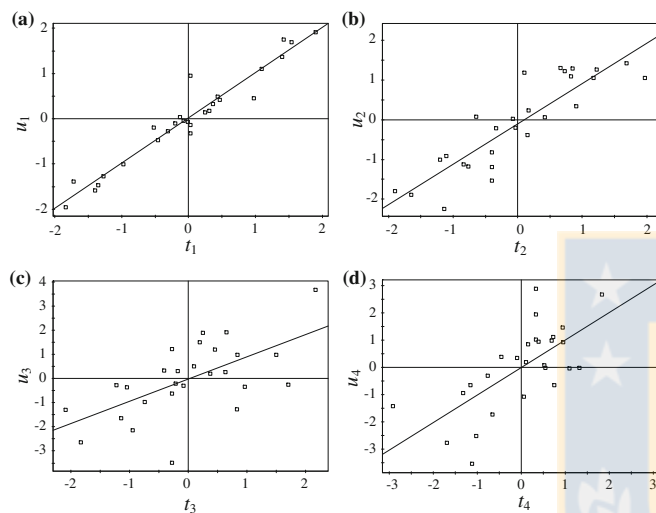


Fig. 3 PLS score plots for the 27 experiments on each model dimension (PLS-component): **a** first model dimension; **b** second model dimension; **c** third model dimension; and **d** fourth model dimension

variable changes are influential for the monitored responses and useful information can be extracted from PLS-components. The second PLS-components (u_2 and t_2) are still reasonably correlated (see Fig. 3b) and the third and fourth PLS-components are shown in Fig. 3c, d, and a more dispersed correlation can be observed.

Beside the individual variables x , interactions between two different variables $x_n x_m$ or between the same variable as quadratic interactions x_n^2 can be found on the studied system. Loading plots allow to overview the relationship between variables x and responses y . Figure 4 shows the main plot of loadings that relates first PLS-component denoted as $w_1 c_1$, against the loadings of the second PLS-component, denoted as $w_2 c_2$. On this plot, variables x and responses y can be correlated, but the influence of interactions among variables ($x_n x_m$ and x_n^2) can be explored as well. When these individual variables or their interaction lie further away from the origin of the plot, the stronger the impact that particular variable has [17, 27]. Among the individual variables under study, the mixing time (t_{mix}) shows the lower impact on the measured responses being close to the origin plot, and Clay% and Comp% have the stronger influences being far away from origin plot. The closeness of a variable and a response shows a correlation between them. The variable Clay% is highly influential on T_m response because they are close to each other, and their place on the same plot quadrant give them the same sign, so when Clay% increases T_m

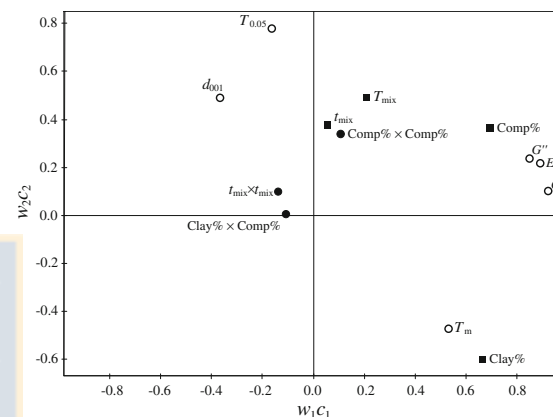


Fig. 4 PLS loading plot: loading of the first PLS-component ($w_1 c_1$) vs. loading of the second PLS-component ($w_2 c_2$), with four variables (filled square), six responses (open circle) and three interactions among variables (filled circle)

increases its value. In the case of Comp%, this variable forms a cluster with the responses E , G' and G'' (see Fig. 4 at right center) because are placed on the same plot quadrant, the Comp% influences positively these three responses: the higher the concentration of compatibilizer on the nanocomposite formulation, the higher these responses are.

Significant ($p \leq 0.05$) interactions among variables ($x_n x_m$ and x_n^2) can be observed on this plot. Quadratic interactions Comp% \times Comp% (x_2^2) and $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ (x_4^2) were found, and a significant ($p \leq 0.05$) crossed interaction between Clay% and Comp% ($x_1 x_2$) was detected. These variable interactions can be related to responses according to their closeness on the plot. For an easier interpretation and a deeper understanding of this loading plot, extra lines can be drawn (see Fig. 5). A response y is taken (marked with a black box) and a reference base-line is drawn passing through the origin plot. From each variable, an orthogonal line is projected onto this reference line. The further away the interception of these projections from the origin, the more potent the variable on this particular response is [17, 27]. For example, in Fig. 5b, Clay% and T_{mix} are the most important variables for decomposition temperature ($T_{0.05}$) response, but with different impact. The intercept of T_{mix} variable and the $T_{0.05}$ response are on the same side of the plot origin, so they are positively correlated: the higher the T_{mix} value, the higher the $T_{0.05}$ response. On the other hand, intercept of Clay% variable is located on the opposite side of the plot origin respecting $T_{0.05}$ response, so this variable is negatively correlated to this response: at higher Clay% on the formulation the lower the response $T_{0.05}$ value. Now taking G' response (see

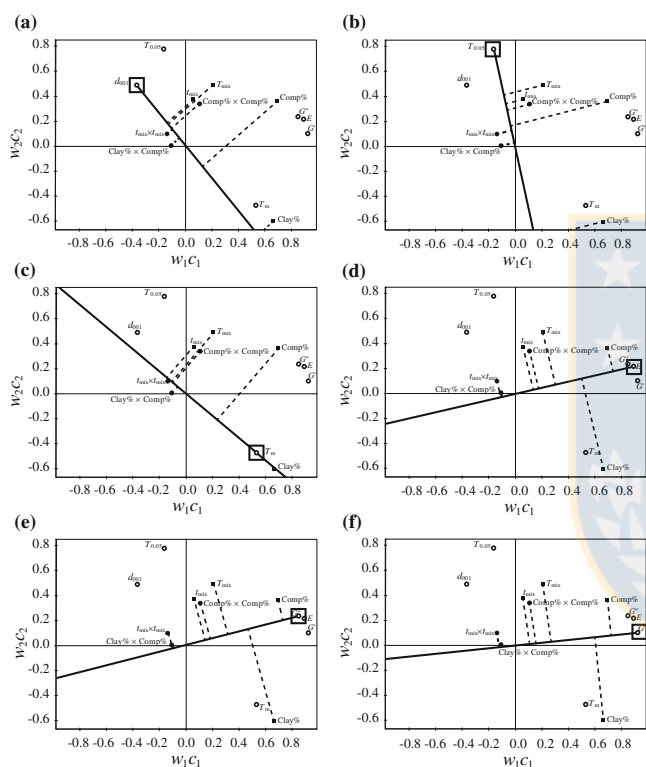


Fig. 5 Interpretation of PLS loading plot for each response: loading of the first PLS-component (w_1c_1) vs. loading of the second PLS-component (w_2c_2). The four variables are plotted with squares (filled square), the six responses plotted with circles (open circle) and the three interactions among variables plotted with dots (filled circle)

Fig. 5f), the interaction variables $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ (x_4^2) and $\text{Clay}\% \times \text{Comp}\%$ (x_1x_2) are the least influence, because its projection intercepts on the reference base-line are almost at the plot origin.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2 \quad (3)$$

PLS-regression of the performed design provides a mathematical model of the LDPE/OMM nanocomposite synthesis, which is represented as a polynomial

function (see Eq. 3). The regression coefficients (b) of this polynomial quantify the impact of each variable x on a particular response y . The magnitude and significance of the PLS-model coefficients for each response is detailed in Table 4. The polynomial terms that have no significance for any response were left aside from the model, so the final PLS model is shown in Eq. 4.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{22}x_2^2 + b_{44}x_4^2 \quad (4)$$

The normalized coefficients can be plotted on a coefficient plot as a graphical representation of how and how much a specific variable x influences a given response y , been a complementary visual overview for PLS-regression interpretation. When a particular coefficient has high values, it means that this variable has an important impact on that response. Back to Fig. 5b, the loading plot indicates that T_{mix} variable is highly and positively correlated with $T_{0.05}$ response, and this is observed on the regression coefficients plot (see Fig. 6) where a large and positive signed coefficient is observed; and $\text{Clay}\%$ coefficient for $T_{0.05}$ is large and negative signed which is predicted by the loading plot. Using the same analysis, the coefficients for t_{mix} , $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ and $\text{Clay}\% \times \text{Comp}\%$ variable for G' response in Fig. 6 are very small as the loading plot predicts, which reflect the low impact that these variables have on G' response.

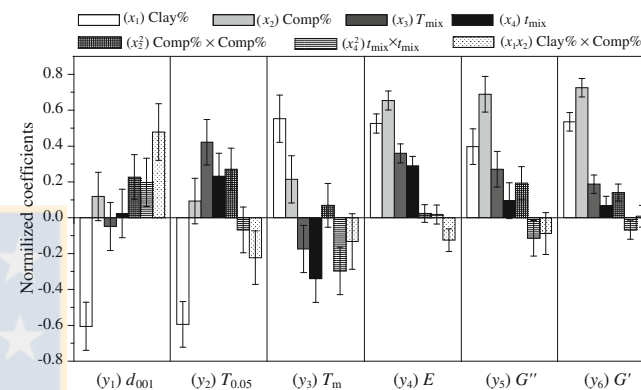
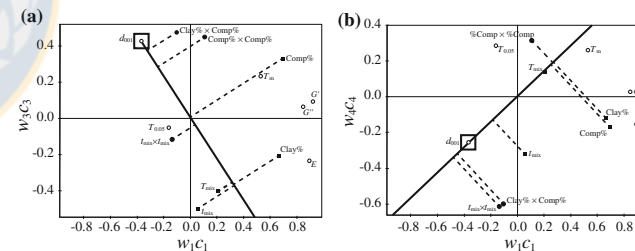
Analyzing Fig. 5d–f, the responses E , G' and G'' lie close together forming a cluster almost on the same loading plot coordinates, and this means that they are strongly correlated responses. According to this, similar coefficient profiles are expected, which can be confirmed observing Fig. 6, where the three mentioned responses E , G' and G'' are positively correlated with their four individual variables x , and with almost the same quantitative impact. And the slight shift of these responses in the loading plot is mainly due to the different profile of interaction coefficients (x_nx_m and x_n^2). On the other hand, responses d_{001} and T_m are located in separated positions on the loading plot, so they should have different set of coefficients profiles, which is observed in Fig. 6.

Coefficient plot shows that important interactions among variables influence several responses. On this plot (see Fig. 6) can be observed that d_{001} response presents a strong $\text{Clay}\% \times \text{Comp}\%$ positive interaction because this coefficient is large and positive signed. Despite this information on coefficients plot, the loading plot (see Fig. 5a) does not represent this situation because this interaction $\text{Clay}\% \times \text{Comp}\%$ intersects the base-line close to the origin plot. But inspecting the loading plot with the third PLS-component this information is found. Figure 7a represents a loading plot for the first and third PLS-component, and shows the huge influence of $\text{Clay}\% \times \text{Comp}\%$ variable on this d_{001} response, which is located far away the origin plot. Moreover, according to the coefficients plot on Fig. 6, both quadratic interactions $\text{Comp}\% \times \text{Comp}\%$ and $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ are important for d_{001} response, and this is observed on the same Fig. 7a, and some of this information is present on the loading plot of the fourth PLS-component as well (see Fig. 7b) where these interactions are located far from the origin plot.

An additional tool for measuring the importance of variables is the VIP parameter (variable importance in the projection). This is a weighted summary of all loadings across all responses, and this plot represents a very condensed information

Table 4 Normalized regression coefficients (*b*) of the PLS model fitted to the experimental data

Polynomial coefficients	γ_1 interlayer distance d_{001}	γ_2 decomposition temperature $T_{0.05}$	γ_3 melting temperature T_m	Young's modulus E	γ_5 loss modulus G''	γ_6 storage modulus G'
constant b_0	30.56 ± 0.23^a ($p = 0.000$) ^b	7.939 ± 0.220 ($p = 0.000$)	239.89 ± 0.23 ($p = 0.000$)	13.30 ± 0.09 ($p = 0.000$)	11.20 ± 0.17 ($p = 0.000$)	13.814 ± 0.087 ($p = 0.000$)
b_1	-0.607 ± 0.134 ($p = 0.000$)	-0.595 ± 0.127 ($p = 0.000$)	0.550 ± 0.132 ($p = 0.001$)	0.525 ± 0.053 ($p = 0.000$)	0.414 ± 0.096 ($p = 0.000$)	0.543 ± 0.050 ($p = 0.000$)
b_2	0.120 ± 0.134 ($p = 0.384$)	0.094 ± 0.127 ($p = 0.467$)	0.217 ± 0.132 ($p = 0.116$)	0.657 ± 0.053 ($p = 0.000$)	0.699 ± 0.096 ($p = 0.000$)	0.727 ± 0.050 ($p = 0.000$)
b_3	-0.052 ± 0.134 ($p = 0.704$)	0.420 ± 0.127 ($p = 0.004$)	-0.177 ± 0.132 ($p = 0.195$)	0.355 ± 0.053 ($p = 0.000$)	0.257 ± 0.096 ($p = 0.014$)	0.174 ± 0.050 ($p = 0.003$)
b_4	0.023 ± 0.135 ($p = 0.868$)	0.231 ± 0.127 ($p = 0.086$)	-0.340 ± 0.133 ($p = 0.019$)	0.291 ± 0.053 ($p = 0.000$)	0.099 ± 0.096 ($p = 0.318$)	0.071 ± 0.051 ($p = 0.177$)
b_{12}	0.477 ± 0.158 ($p = 0.007$)	-0.224 ± 0.149 ($p = 0.149$)	-0.131 ± 0.155 ($p = 0.407$)	-0.129 ± 0.063 ($p = 0.053$)	-0.080 ± 0.113 ($p = 0.485$)	0.014 ± 0.059 ($p = 0.815$)
b_{22}	0.228 ± 0.125 ($p = 0.082$)	0.269 ± 0.118 ($p = 0.034$)	0.069 ± 0.122 ($p = 0.577$)	0.020 ± 0.049 ($p = 0.683$)	0.181 ± 0.089 ($p = 0.056$)	0.129 ± 0.047 ($p = 0.013$)
b_{44}	0.197 ± 0.135 ($p = 0.160$)	-0.066 ± 0.127 ($p = 0.608$)	-0.296 ± 0.132 ($p = 0.038$)	0.019 ± 0.053 ($p = 0.732$)	-0.104 ± 0.096 ($p = 0.250$)	-0.060 ± 0.051 ($p = 0.249$)

^a Standard deviation^b *p* value significance of the coefficient**Fig. 6** Normalized regression coefficients (*b*) plot for individual variable effects (x_i) and interaction effects ($x_i x_j$) for each response of the experimental design model after four PLS-components**Fig. 7** PLS loading plots that include the loadings of the third (w_3c_3) and fourth (w_4c_4) PLS-components with the four variables (filled square), six responses (open circle) and three interactions among variables (filled circle). **a** loading plot with the loadings of the first and third PLS-component, **b** loading plot with the loadings of the first and fourth PLS-component

of PLS model [17, 26]. Model terms with VIP-values higher than 0.7–0.8 are the most influential in the model. Figure 8 shows that Clay% and Comp% are the most important variables, with VIP-values of 1.597 and 1.545, respectively. Mixing time t_{mix} is the least influential individual variable on the system with a VIP-value of 0.648, but despite this low impact as a single variable, t_{mix} has a significant ($p \leq 0.05$) quadratic variable ($t_{mix} \times t_{mix}$) that models several responses. A strong and significant ($p \leq 0.05$) interaction between two variables (Clay% \times Comp%) is present on the modeled system, mainly affecting the behavior of d_{001} response (see Fig. 6).

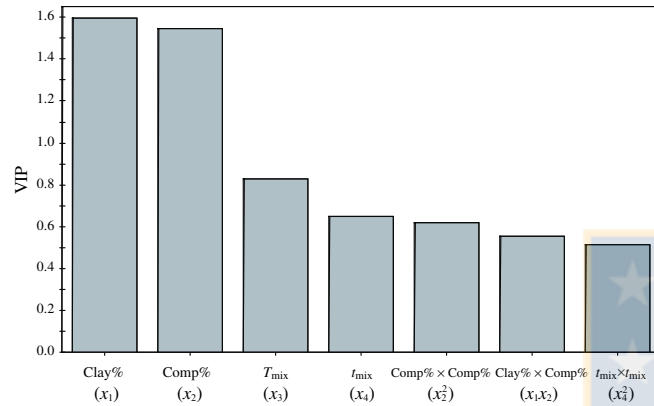


Fig. 8 Variable importance plot (VIP) for processing parameters of LDPE/OMM nanocomposite synthesis using PLS-regression showing (x_n) individual variables and ($x_n x_m$ and x_n^2) interactions among variables

Response surface methodology (RSM) interpretation

Response surface plots for each individual response y (see Fig. 9) were obtained for a deeper analysis of processing parameters effects and inspection of interactions among variables. These surface maps are a mathematical representation of the system derived from PLS-regression model, which can be viewed as a map of the investigated region and reflects the relationship between variables x and responses y and provides a prediction of system behavior for each response on the investigated experimental region.

Three different models can be observed from the 3D response surface plots. A linear-type model on response E (y_4) can be observed (see Fig. 9d), presenting a map surface with planar shape which reflects that variables plotted have no significant interactions among them on this particular response on the studied region. This can be corroborated by coefficient plot for E response (see Fig. 6) where small coefficients for the three interaction variables ($x_n x_m$ and x_n^2) are observed. The effect of a variable on the E response on this plot must be interpreted on the edges of the 3D, where it can be observed that at high values of Comp% higher values of E are obtained, independently of the t_{mix} , which behaves the same at each value of Comp%.

Quadratic-type models (x_n^2) are observed on response surface plots for responses $T_{0.05}$ and T_m (see Fig. 9b, c). These plots present a curved surface, due to the presence of significant quadratic coefficients on the regression model. Melting temperature T_m response shows a notorious curved surface on the t_{mix} axis (see Fig. 9c), and this means that a maximum on the T_m response is reached on the t_{mix} studied range, which presents a maximum response about 10 min of mixing time.

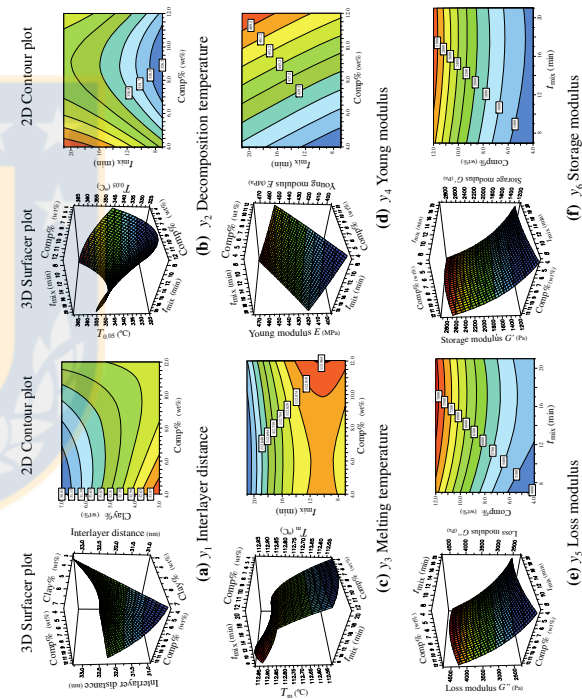


Fig. 9 3D response surface plots and 2D response contour plots for each response y determined by PLS-regression: **a** y_1 interlayer distance at fixed $T_{mix} = 130$ °C and $t_{mix} = 7$ min; **b** y_2 decomposition temperature at fixed Clay% = 7.0 wt% and $T_{mix} = 170$ °C; **c** y_3 melting temperature at fixed Clay% = 7.0 wt% and $t_{mix} = 170$ °C; **d** y_4 Young's modulus at fixed Clay% = 3.0 wt% and $T_{mix} = 130$ °C; **e** y_5 loss modulus at fixed Clay% = 3.0 wt% and $T_{mix} = 130$ °C; and **f** y_6 storage modulus at fixed Clay% = 3.0 wt% and $T_{mix} = 130$ °C

Figure 6 shows the $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ coefficient for T_m response is large, so this explains the strong curvature of the response when this processing parameter is changed on the formulation. In the case of $T_{0.05}$ a similar curvature is observed on Comp% axis (see Fig. 9b), showing a minimum response when Comp% on the formulation is set about 9.0 wt%, which is due to the presence of a quadratic coefficient Comp% \times Comp% on the regression model for this response (see Fig. 6). A slightly curved 3D surface plot is present on G'' and G' responses (see Fig. 9e, f) on the Comp% axis and t_{mix} axis, which is due to both interaction effects Comp% \times Comp% and $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$, and this is expressed on the relatively low impact coefficients of both interactions on these responses (see Fig. 6). Moreover, it can be observed that G'' and G' plot responses are almost identical because of the similar coefficient profile of these responses.

Interaction-type model ($x_n x_m$) is present on d_{001} response and it is represented on the 3D surface plot in Fig. 9a, where a twisted surface is observed. This twisted form is due to the influence of an interaction between two different variables on the response. For d_{001} response a significant interaction ($p \leq 0.05$) between Clay% and Comp% ($x_1 x_2$) is observed, and this can be detected because of the different slopes of the edges on Clay% axis. These slopes can be represented on a new interaction plot (see Fig. 10) for a clearer overview. This plot shows an intersection of the lines and is observed that when high Clay% is used on the nanocomposite formulation, a high Comp% must be used to increase the d_{001} response, and when low Clay% is used on the formulation, a low Comp% must be used to increase the response.

Extracting all this information from response surface plots, score plots, loading plots, regression coefficient plots, and VIP plots, a more integral and complete knowledge of the LDPE/OMM nanocomposite synthesis system can be obtained, and responses can be modeled and predicted on the studied experimental region.

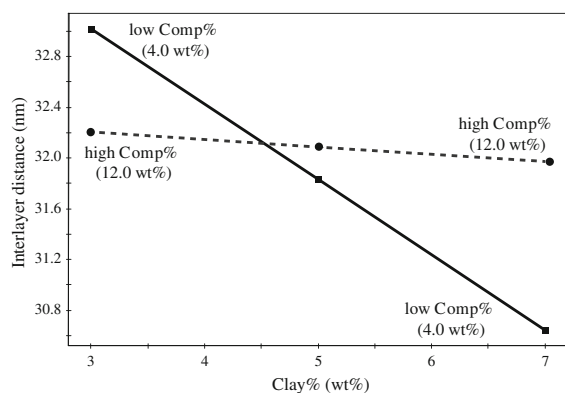


Fig. 10 Interaction effect plot of Clay% and Comp% with regard to interlayer distance response d_{001} obtained from RSM fitted by PLS-regression

This integral knowledge of the system behavior for nanocomposite synthesis provides precious information about which optimal processing parameters must be set for the studied variables to get a particular response, and which interaction among variables must be taken into account when nanocomposite films is produced under these conditions.

Conclusions

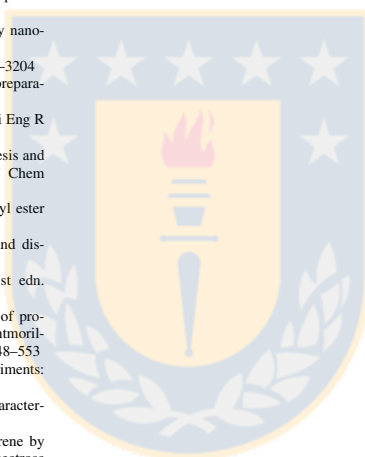
Synthesis of LDPE/OMM nanocomposite films by direct melt processing method was performed using DOE, evaluating Clay%, Comp%, T_m and t_{mix} as processing parameters measuring six different responses. The central composite circumscribed experimental design allowed the reduction of the number of experiments, maximizing the information obtained. PLS-regression modeled the four variables and six responses simultaneously after four PLS-components with a $R^2 = 0.768$, despite some missing experimental data, and showed that Clay% and Comp% are the variables that have the largest impact, and t_{mix} the least influential. Despite t_{mix} has a low impact on measured responses, large quadratic interaction $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$ is observed, along with a Comp% \times Comp% interaction. A significant ($p \leq 0.05$) interaction between Clay% and Comp% was detected which mainly affects d_{001} response. Exploration of loading plots and coefficient plots—combined or separately—results in great utility when complex data is treated, like nanocomposite synthesis, becoming powerful tools for exploring relationships among variables x and responses y . RSM is a powerful tool for detection of interaction among variables— $x_n x_m$ and x_n^2 —which is reflected on RSM plots where strong interaction among Clay%, Comp% and t_{mix} can be observed. RSM shows a linear-type model behavior on E response, a quadratic-type model (Comp% \times Comp% and $t_{\text{mix}} \times t_{\text{mix}}$) for $T_{0.05}$, T_m , G'' and G' , and an interaction model (Clay% \times Comp%) for d_{001} response. Taking into account the tremendous potential of these underutilized chemometric tools, DOE, PLS-regression and RSM must be considered for scientific and engineering polymer community when polymer synthesis is carried out facing several variables and several responses that must be correlated and interpreted simultaneously.

Acknowledgments The authors thank FONDEF (Grant No. DI01234), REDOC (MINEDUC Project UCO1202 at U. de Concepción) and CONICYT REGIONAL CIPA (Centro de Investigación de Polímeros Avanzados) R08C1002. Víctor H. Campos-Requena gratefully thanks CONICYT-Chile for its financial support through Doctoral Thesis Support Grant 24110010 and Doctoral Studies in Chile Support Grant 21090205; to Grant MEC2-Chile UCH0601 for Abroad Doctoral Stay financial support; to Heinrich-Hertz-Gesellschaft, D-76131 Karlsruhe and Karlsruher Universitätsgesellschaft e.V., D-76049 Karlsruhe for their financial support; and also thanks to Mónica Uribe from GEA-UdeC.

References

- Pavlidou S, Papispyrides CD (2008) A review on polymer-layered silicate nanocomposites. Prog Polym Sci 33:1119–1198
- Golebiewski J, Rozanski A, Dzwonkowski J, Galeski A (2008) Low density polyethylene-montmorillonite nanocomposites for film blowing. Eur Polym J 44:270–286

3. Osman MA, Rupp JEP, Suter U (2005) Tensile properties of polyethylene-layered silicate nanocomposites. *Polymer* 46:1653–1660
4. Morawiec J, Pawlak A, Slouf M, Galeski A, Piorkowska E, Krasnikowa N (2005) Preparation and properties of compatibilized LDPE/organo-modified montmorillonite nanocomposites. *Eur Polym J* 41:1115–1122
5. Zhai H, Xu W, Guo H, Zhou Z, Shen S, Song Q (2004) Preparation and characterization of PE and PE-g-MAH/montmorillonite nanocomposites. *Eur Polym J* 40:2539–2545
6. Zhao C, Qin H, Gong F, Feng M, Zhang S, Yang M (2005) Mechanical, thermal and flammability properties of polyethylene/clay nanocomposites. *Polym Degrad Stabil* 87:183–189
7. Zhong Y, Janes D, Zheng Y, Hetzer M, De Kee D (2007) Mechanical and oxygen barrier properties of organoclay-polyethylene nanocomposite films. *Polym Eng Sci* 47(7):1101–1107
8. Pérez MA, Rivas BL, Rodríguez SM, Maldonado A, Venegas C (2010) Polypropylene/clay nanocomposites. Synthesis and characterization. *J Chil Chem Soc* 55(4):440–444
9. Paul DR, Robeson LM (2008) Polymer nanotechnology: nanocomposites. *Polymer* 49:3187–3204
10. Sinha-Ray S, Okamoto M (2003) Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog Polym Sci* 28:1539–1641
11. Tjong SC (2006) Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. *Mater Sci Eng R* 53:73–197
12. Contreras D, Moreno Y, Salgado Y, Cárdenas G, Baggio R, Peña O, Pivan JY (2007) Synthesis and optimization of experimental variables of a hybrid organic-inorganic compound. *New J Chem* 31:1751–1754
13. Yong V, Hahn HT (2005) Dispersant optimization using design of experiments for SiC/vinyl ester nanocomposites. *Nanotechnology* 16:354–360
14. Box G, Hunter JS, Hunter WG (2005) *Statistics for experimenters—design, innovation, and discovery*, 2nd edn. Wiley-Interscience, New Jersey
15. Bruns RE, Scarminio IS, de Barros-Neto B (2006) *Statistical design—chemometrics*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam
16. Campos-Requena VH, Rivas BL, Pérez MA, Contreras D, Muñoz E (2013) Optimization of processing parameters for the synthesis of low-density polyethylene/organically modified montmorillonite nanocomposites using X-ray diffraction with experimental design. *Polym Int* 62(4):548–553
17. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-World N, Wikström C, World S (2000) *Design of experiments: principles and applications*, 3rd edn. Umetrics, Stockholm
18. Barbas JM, Machado AV, Covas JA (2012) In-line near-infrared spectroscopy for the characterization of dispersion in polymer-clay nanocomposites. *Polym Test* 31(4):527–536
19. Brun N, Bourson P, Margueron S (2013) Quantification of rubber in high impact polystyrene by Raman spectroscopy. Comparison of a band fitting method and chemometrics. *Vib Spectrosc* 67:55–60
20. Real BD, Ortiz MC, Sarabia LA (2007) Analysis of interferences by means of a D-optimal screening design and calibration using partial least squares regression in the spectrophotometric determination of Cr(VI). *Talanta* 71:1599–1609
21. Dejaegher B, Vander Heyden Y (2011) Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J Pharm Biomed* 56:141–158
22. Almeida-Bezerra M, Erthal-Santelli R, Padua-Oliveira E, Silveira-Villar L, Escalera LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965–977
23. Faria R, Duncan JC, Brereton RG (2007) Dynamic mechanical analysis and chemometrics for polymer identification. *Polym Test* 26(3):402–412
24. Sulub Y, DeRudder J (2013) Determination of polymer blends composed of polycarbonate and rubber entities using near-infrared (NIR) spectroscopy and multivariate calibration. *Polym Test* 32(4):802–809
25. Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies T (2002) *Multivariate calibration and classification*, 1st edn. NIR Publications, Chichester
26. Wold S, Sjöström M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Syst* 58:109–130
27. Geladi P, Manley M, Lestander T (2003) Scatter plotting in multivariate data analysis. *J Chemom* 17:503–511
28. Höskuldsson A (1988) PLS regression methods. *J Chemom* 2:211–228





VI Coloquio de Macromoléculas
Termas de Catillo
5-8 de diciembre de 2012



División de Macromoléculas



VI Coloquio de Macromoléculas
5-8 de Diciembre de 2012, Termas de Catillo,
Catillo, Parral, Chile

OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE PROCESO PARA LA SÍNTESIS DE NANOCOMPUESTOS DE POLI(ETILENO) DE BAJA DENSIDAD/MONTMORILLONITA MODIFICADA UTILIZANDO DISEÑO EXPERIMENTAL

Victor H. Campos-Requena,^{ab} Bernabé L. Rivas,^b Mónica A. Pérez,^b David Contreras,^b Eduardo Muñoz.^c ^aFacultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile, ^bFacultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile, ^cFacultad de Ciencias, Instituto de Química, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4059, Valparaíso, Chile. vcamposr@udec.cl

Los parámetros de proceso en la síntesis de nanocompuestos juegan un importante rol para alcanzar altos niveles de intercalación en las formulaciones, las cuales tienen un gran impacto en las diferentes propiedades de estos materiales. Estos parámetros muestran íntimas interacciones entre ellos, las cuales conllevan a resultados complejos, y a veces, a conclusiones contradictorias en la literatura al tratar de definir los parámetros óptimos de síntesis.

Utilizando difracción de rayos X (XRD) y microscopía de fuerza atómica (AFM), este trabajo evalúa y discute los parámetros de procesos óptimos para la síntesis de nanocompuestos de poli(etileno) de baja densidad/montmorillonita (PEBD/MM) modificada mediante el método de fusión directa usando diseño experimental y metodología de superficie respuesta.

Al aumentar la concentración de arcilla y el tiempo de mezcla se observa un incremento en la intercalación de las formulaciones, y por otro lado, la temperatura de mezcla no tiene un efecto significativo en la intercalación. Existe además una fuerte interacción entre la concentración de arcilla y la concentración del agente compatibilizante, en donde la intercalación se ve incrementada cuando la proporción entre ambos se acerca a la unidad.

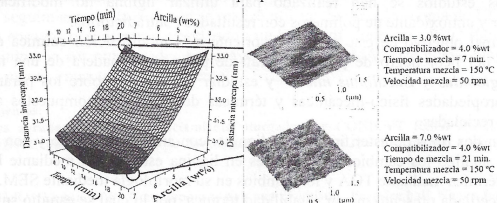


Fig.1. Superficie respuesta de distancias intercapas en formulaciones de nanocompuestos de PEBD/MM determinados por XRD y AFM.

Agradecimientos: FONDEF (D1011234), CONICYT-Chile (24110010, 21090205), Red Universitaria Cruz del Sur, CONICYT REGIONAL/CIPA/R08C1002; Mónica Uribe (GEA-UdeC).

Referencias:

1. M.A. Pérez, B.L. Rivas, S.M. Rodríguez, A. Maldonado, C. Venegas, *J Chil Chem Soc* 55,4, 440 (2010).
2. V. Yong, H.T. Hahn, *Nanotechnology* 16, 354 (2005)

O-8

LIBRO DE RESÚMENES

VI COLOQUIO DE MACROMOLÉCULAS CM-6

Termas de Catillo, Parral Chile,
5-8 de diciembre de 2012



ICCE-21

**TWENTY FIRST ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE
ON COMPOSITES/NANO ENGINEERING**

Edited by
David Hui

July 21-27, 2013
Tenerife, Canary Islands, Spain

Sponsored and organized by  Universidad de La Laguna

International Community for Composites/Nano Engineering and
University of La Laguna, Tenerife, Canary Islands, Spain

Session 12a GENERAL 12 Thurs 8:30-10:30AM Ballroom
Chairs: Y.F. Liu, H.G. Xiao, S. Piazza, M. Prozorova
Reversible Hydrogen Storage Behaviors Of LiBH₄-Mg(OH)₂
Composite Yongfeng LIU, Yu Zhang, Hai Zhou, Mingxia Gao,
Hongge Pan (Zhejiang U., Hangzhou, China)
**Effect Of Conductive Network On The Piezoresistivity Of
Nanocomposites** Huiqiang XIAO, Jinbao Jiang, Guanjin Wang
(Harbin I.T., China)
**Formation Of Porous Silicon Sensor For Bio-Chemical
Applications** Arman VARDANYAN, Gagik AYVAZYAN, Karen
Mimasyan (St. Engg. U. Armenia, Yerevan)
**On Formation Of Nanomodified Prepregs From Polymer
Papers** LM. Zakarov, AV. Naimov (NNTU, Tatarstan,
Russia)(KNTU, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia)
**Structure And Mechanical Properties Of Detonation Powder
Coating Of Aluminum Oxide On The Titanium Surfaces**
Marina KOVALEVA, M. Prozorova, M. Arsenko(Belgorod St. U.,
U. Russia), Yuriy Tyurin, O. Kolisnichenko, V.Ivanenko (Kyiv,
Ukraine)
**Al₂O₃ Powder Coatings Formed By Using Gas-Dynamic
Accelerator And Properties Of These Coatings** Mayya
PROZOROVA, M. Kovaleva, M. Arsenko (Belgorod St. U.,
Russia), Yuriy Tyurin, O. Kolisnichenko, V. Ivanenko (Kyiv,
Ukraine)

Session 12b MAGNETIC 5 Thurs 8:30-10:30AM Room B
Chairs: P. Chiriacanu, I. Mirza, M. Galin, E.N. Siganos
**Optimizing Processing Parameters for the Synthesis of Low-
Density Poly(Ethylene)/Organically-Modified Montmorillonite
Nanocomposites By Using Design Of Experiments And X-Ray
Diffraction** Victor H. Campos-Requeña, Bernabe J. Rivas,
Monica A. Perez, David Gonzalez-Parra (arrido (U. Concepcion,
Chile), Eduardo Muñoz (Pontifical Catholic U. Valparaiso,
Chile)(Tues-Fri)
**Investigation Of Strongly Anisotropic Magnetic Molecular
Materials By Ab Initio Methods** Liviu Ungur, Liviu F.
CHIBOTARU (Katholieke U. Leuven, Belgium)
**A Study Of Silver Nanoparticle Films Prepared By Nanosecond
And Femtosecond Laser Ablation** Inam MIRZA, Jing Jing Wang,
James G. Lunney (Trinity Coll., Dublin, Ireland)
**Femtosecond Pulsed Laser Deposition Of Silver Nanoparticle
Films** Inam Mirza, J.J. Wang, J.G. LUNNEY (Trinity Coll, Dublin,
Ireland)
**Optical Properties Of CdTe/Zn Te Self-Assembled Quantum
Dots** Martina GILIC (Inst. Physics, Belgrade, Serbia)
Raman Study Of Surface Optical Phonons in ZnO(Co)
Nanoparticles Branka HADZIC (Inst. Physics, Belgrade, Serbia)
**Laser-Induced Formation Of Nanostructural Glass-Ceramic
Patterns For Broadband Luminescence** Vladimir N. SIGAEV,
S.V. Lotarev, A.S. Lipatnev, N.V. Golubev, E.S. Ignat'eva, Yu.S.
Priseko, R. Lorenzi, A. Palazzi (Mendeleev U.Chem.Tech., Russia)

Session 12c OXIDE 2 Thurs 8:30-10:30AM Room C
Chair: T. Tsuchiya, Hong Yong SOHN
**Interface Resistance Switching Phenomena In The Transition
Metal Oxide Junction Device** Yoshinobu NAKAMURA,
Yuichi Okabe, Ryo Matsumoto, Takumi Nemoto (U. Tokyo,
Japan), Kohei Fujiwara (Osaka U., Japan), Hidenori Takagi (U.
Tokyo, Japan) invited 24 min
**Ultrasonic Spray Assisted Mist Chemical Vapor Deposition and
Characterization of p-type Cu₂O Thin Films**
Takumi IKENOUE, Shin-ichi Sakamoto and Yoshitaka Imai (U.
Shiga Pref., Japan)
**Plasma Synthesis Of Thermally Stable Yttria-Doped Zirconia
Nanopowder** Hong Yong SOHN (U. Utah), Taegjong Ryu
(Daejeon, S. Korea), Young Joon Choi, Soo Hyun Hwang (U.
Utah), Insoo Kim (Dong-A Univ., Busan, S.Korea)
Facile Method for Preparation of Nano MoS₂
H.H. Phuc NGUYEN, Teruhisa Okuno, Norio Hakiri, Go Kawamura,
Matsuda Atsunori, Muto Hiroyuki (Toyohashi U.T., Japan)
Influence Of Dopants On Structure Of Bismuth-Based Ceramics
Dionizy CZEKAJ, Agata Lisinska-Czekaj (U. Silesia, Poland)
**Impedance Spectroscopy Studies Of Vanadium-Modified BiNbO₇
Ceramics** Agata LISINSKA-CZEKAJ, Malgorzata Adamczyk, Dionizy
Czekaj (U. Silesia, Poland)
**Improvement Of Dielectric Properties of BiNbO₇ Ceramics By
Processing Conditions** Malgorzata ADAMCZYK, A. Lisinska-Czekaj, D.
Czekaj (U. Slaski w Katowicach, Poland)

Session 12d CHEM 2 Thurs 8:30-10:30AM Room D
Chairs: Eva Pellicer and Yoshinobu Nakamura (Tokyo U.)
**Synthesis Of Copper Sulfide Nanoparticles By Combined Successive
Ionic Layer Adsorption And Reaction (SILAR) And Ion Exchange
Methods** Mustafa H. MURADOV, G.M.Eyazova (Baku St. U.,
Azerbaijan), A. Kukovetz, Z. Konya (U. Szeged, Hungary), R. Turan
(METU, Turkey)
**Effects Of Plasma Irradiation On Surface Of PET Characterized By
ATR-FTIR** Kazuya HANADA, Xisopai Zhu, Kenichi Uehara, Miyoshi
Yokota (Mie U., Japan), Masaru Nagashima (Stech Co., Japan), Hiroaki
Nishikawa (Kinki U., Japan), Yoshinobu Nakamura (U. Tokyo, Japan),
David Hui (U. New Orleans), Abdalla Darwish (Dillard U., New Orleans,
LA), Tamio Endo (Mie U., Japan)
**Gold-Pentamidine Nanohybrids And In Vitro Evaluation Of Their
Activity Against Leishmania Amazonensis** Jaakko Tuunanen (U.
Helsinki, Finland), Claudia D. C. Wyrepkowski (CSAS, Manaus, Brazil),
Iryna Grafova (U. Helsinki), Antonia M. R. Franco (CSAS, Brazil), Markku
Leskela, Andriy Grafov (U. Helsinki) Tues-Fri
Inorganic Nanoparticles For Topical Treatment Of Cutaneous Leishmaniasis
Iryna Grafova (U. Helsinki, Finland), Claudia Dantas Contandelli-Wyrepkowski,
Antonia Maria Ramos Franco (Nat. Inst., Manaus, Brazil), Markku Leskela, Andriy
Grafov (U. Helsinki) Tues-Fri
Nanocomposites Synthesized By Evaporation In Electric ARCS.
Yu Zaganichenko, Al. D. Zolotarevko, An. D. Zolotarevko (Kiev, Ukraine)
**Cost-Effective Composite Electroplating From Particle-Free Aqueous
Electrolytes** Eva PELLICER (U. Auto Barcelona, Spain), Karim M. Sivanman
(ETH, Zurich, Switzerland), Maria D. Bato, Santiago Surinach (U. Auto Barcelona),
Bradley J. Nelson (IRIS, Zurich), Jordi Sori (U. Auto Barcelona), Salvador Pane
(ETH Zurich) chair
**Factors Influencing The Performance Of SERRS Spectral Sensors Based On Ag
Nanoparticle Assemblies** Blanka Vekrova, M. Koloskova, Ivana Sloufova, P.
Mojzes, M. Prochazka (Charles U., Prague, Czech Rep.)
**Sulfonated Polybenzimidazole Containing Ether Units As Electrolyte
Membrane For High Temperature PEMFCs** Hong ZHU (BUCT,
Beijing, China)

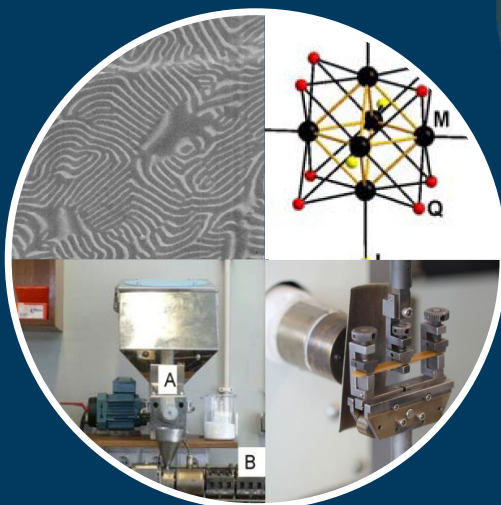


UNIVERSITAT
JAUME I

POLYMAR 2013

1ST International Conference in Polymers
with special Focus in Early Stage Researchers

José M. Lagarón, Luis Cabedo,
Amparo López, María J. Fabra (eds.)



USD
USD

Col·lecció
e-Treballs d'Informàtica i Tecnologia
Núm. 17

POLYMAR 2013

COMBINATION OF DESIGN OF EXPERIMENTS, RESPONSE SURFACE METHODOLOGY AND PARTIAL LEAST SQUARES REGRESSION ON NANOCOMPOSITE SYNTHESIS

Víctor H. Campos-Requena^{1,2*}, Bernabé L. Rivas², Mónica A. Pérez² and Manfred Wilhelm³

1. Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.
2. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción Chile
3. Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry, KIT, Engesserstraße 18, 76128 Karlsruhe, Germany
*vcampos@udec.cl

ABSTRACT

Synthesis and characterization of low density poly(ethylene)/organically-modified montmorillonite (LDPE/OMM) nanocomposites films was performed applying and combining three chemometric tools: design of experiments (DOE), response surface methodology (RSM) and partial least squares regression (PLSR). DOE allows the reduction of the number of experiments but maximizing the information obtained from the system. PLSR allows to find the relationships among variables and responses, how they behave in the system, and which interactions among variables are present. RSM plots are used to explore and analyze the interactions among factors and the prediction of responses on the studied experimental region.

A DOE with a central composite circumscribed design was used to perform and evaluate the influence of four processing parameters of nanocomposite synthesis: concentration of clay (Clay-%), concentration of compatibilizer (Comp-%), mixing temperature (T_{mix}) and mixing time (t_{mix}). Their influences were evaluated on six different responses: clay intercalation (d_{001}), degradation temperature (T_{deg}), melting temperature (T_m), Young modulus (E), loss modulus (G'') and storage modulus (G').

A total of 27 experiments were carried out and an ANOVA-validated PLSR was used to evaluate the relationship between the processing parameters and the different measured responses using score plots, loading plots (Figure 1a), coefficient plots and RSM plots (Figure 1b). The six responses were simultaneously PLSR-modeled with a $R^2 = 0.768$ ($p < 0.05$) being Comp-% and Clay-% the most important processing parameters, and t_{mix} was the least influential parameter. Moreover, significant and complexes interactions among Comp-%, Clay-% and t_{mix} were found.