



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Químicas-Programa de Doctorado en Ciencias con Mención en  
Química

## **Bionanocompuestos de Polihidroxitirato/Almidón con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes**

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

Karla Andrea Garrido Miranda

CONCEPCIÓN-CHILE

2018

Profesor Guía: Dr. Bernabé L. Rivas Quiroz

Profesora Co-Guía: Dra. Mónica Pérez Rivera

Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas

Universidad de Concepción



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Químicas-Programa de Doctorado en Ciencias con Mención en  
Química

## **Bionanocompuestos de Polihidroxitirato/Almidón con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química.

Karla Andrea Garrido Miranda

CONCEPCIÓN-CHILE

2018

Profesor Guía: Dr. Bernabé L. Rivas Quiroz

Profesora Co-Guía: Dra. Mónica Pérez Rivera

Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas

Universidad de Concepción

Comisión: Dra. Susana Sánchez. Universidad de Concepción

Dr. Claudio Jiménez. Universidad de Concepción

Miembro externo: Dr. Luis H. Tagle D. Pontificia Universidad Católica

## DEDICATORIA



A mi amada sobrina, Catalina

## AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a las entidades que hicieron posible mis estudios de postgrado: Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por la beca de doctorado otorgada y el apoyo para asistencia a congresos y pasantías. A la Red Doctoral en Ciencias, Tecnologías y Ambiente (REDOC) por la beca de pasantía a la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil. A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) por la beca de Doctorado Nacional 2016 N°21161368 y por las Becas de Asistencia a Eventos para Estudiante de Doctorado 2016 y 2017.

A mis profesores guía Dr. Bernabé Rivas y la Dra. Mónica Pérez, por todo su apoyo, confianza y colaboración otorgada en estos años, además de su contribución a mi desarrollo y formación como científica.

Al Dr. Miguel Martines de microbiología y al Dr. Eugenio Sanfuentes de forestal, por facilitar los espacios para los ensayos microbiológicos. Al Dr. Juan Pedro Fernández y Dr. Miguel Monclús del Instituto IMDEA de materiales por su amabilidad, confianza y apoyo que me entregaron en mi estadía en el instituto. A la Dra. Raquel S. Mauler de la UFRGS por su apoyo en la estadía realizada en su grupo de investigación.

A mi madre Amelia Miranda y mi padre Carlos Garrido por apoyar todos mis desafíos. A Claudia por su constante apoyo, paciencia y cariño, eres la mejor compañera en los buenos y malos momentos. A mis hermanos Carlos y Carolina, a mis sobrinos por todo el amor que me dan, porque su compañía siempre me llena de energía.

A mis compañeros de doctorado por su amistad, Daniela, Juan David, Myleidi, Daniel, Yadiris, Saul, Karla y José. A Lorena, Eduardo y Lesli porque en los momentos de trabajo en laboratorio fueron la mejor distracción y compañía. Al Departamento de Polímeros por cobijarme como una más durante todos estos años, a Yéxica, Claudio y Bernardita.

## TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Residuos de plásticos .....	1
1.2 Polímeros Biodegradables.....	4
1.3 Envases activos. ....	6
1.4 Bionanocompuestos poliméricos .....	11
1.5 Polihidroxicanoatos.....	15
1.6 Almidón.....	18
1.7 Problemática a resolver.....	20
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
2.1 Hipótesis.....	21
2.2 Objetivo general .....	21
2.3 Objetivos específicos .....	21
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
3.1 Reactivos.....	22
3.2 Metodología .....	23
3.2.1 Obtención de bionanocompuesto con actividad antioxidante y antifúngica .....	23
3.2.1.1 Obtención de almidón termoplástico (ATP) .....	23
3.2.1.2 Obtención de mezclas PHB-ATP .....	24
3.2.1.3 Obtención de bionanocompuesto PHB-ATP/Arcilla .....	24
3.2.1.4 Obtención de bionanocompuestos con Eugenol PHB-ATP/OMMT/Eug .....	25

3.2.2 Caracterización .....	25
3.2.2.1 Análisis estructural bionanocompuestos .....	25
3.2.2.2 Análisis morfológico de los bionanocompuestos .....	26
3.2.2.3 Propiedades mecánicas de los bionanocompuestos .....	27
3.2.2.4 Propiedades reológicas .....	28
3.2.2.5 Propiedades térmicas de los bionanocompuestos.....	29
3.2.2.6 Actividad Antifúngica <i>in vitro</i> de los bionanocompuestos .....	29
3.2.2.7 Actividad Antioxidante de los bionanocompuestos .....	30
3.2.2.8 Cuantificación de Eugenol en los bionanocompuestos .....	30
3.2.2.9 Ensayo de biodegradación de los bionanocompuestos .....	31
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
4.1 Obtención de almidón termoplástico (ATP) .....	33
4.1.1 Análisis Estructural y Morfológico .....	33
4.2 Obtención de mezcla de polímeros (PHB-ATP).....	35
4.2.1 Diseño de experimento, definición de parámetros .....	35
4.2.2 Análisis estructural y morfológico.....	40
4.2.3 Propiedades térmicas .....	43
4.3 Obtención de bionanocompuesto .....	47
4.3.1 Diseño de experimento, definición de parámetros .....	47
4.3.2 Análisis Morfológico de los bionanocompuestos.....	53
4.3.3 Propiedades térmicas .....	57
4.3.4 Propiedades Mecánicas.....	62
4.4 Bionanocompuestos con Eugenol .....	63
4.4.1 Diseño de experimento, definición de parámetros .....	63
4.4.2 Propiedades morfológicas.....	67
4.4.3 Propiedades térmicas .....	71
4.5 Bionanocompuestos con propiedad antimicrobiana, antioxidante y biodegradable .....	74
4.5.1 Análisis Morfológico .....	74

4.5.2 Análisis topográfico.....	77
4.5.3 Propiedades mecánicas .....	79
4.5.4 Propiedades térmicas .....	86
4.5.5 Actividad antioxidante de las películas de bionanocompuestos.....	89
4.5.6 Ensayo antifúngico .....	91
4.5.7 Desintegración bajo condiciones de compostaje .....	93
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>98</b>
5.1 Perspectiva .....	100
<b>REFERENCIAS. ....</b>	<b>101</b>
<b>CAPÍTULO 6. ANEXO .....</b>	<b>116</b>
6.1 Publicaciones.....	116
6.2 Participación en eventos.....	116



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Ejemplos de los tipos de plásticos más utilizados, los que fueron clasificados en Termoplásticos y Termoestables. ....	1
Tabla 1.2. Comparación de propiedades térmicas y mecánicas de un PHA con un polímero sintético. <sup>90</sup> .....	17
Tabla 3.1. Formulación estudiada para la obtención de ATP. ....	24
Tabla 3.2. Datos sobre la composición en volumen de las muestras utilizadas para realizar la recta patrón cuando se utiliza etanol como solvente. ....	31
Tabla 4.1. Número de experimentos realizados según el diseño de experimento FFD con su respectiva respuesta del módulo elástico para las diferentes mezclas obtenidas. ....	36
Tabla 4.2. Parámetros obtenidos para evaluar el modelo obtenido por regresión lineal multiple. ....	37
Tabla 4.3. Propiedades térmicas (DSC y TGA) para PHB y mezclas PHB-ATP. ....	44
Tabla 4.4. Número de experimentos realizados según el diseño de experimento FFD con su respectiva respuesta (módulo elástico) para las diferentes bionanocompuestos. ....	47
Tabla 4.5. Parámetros obtenidos para evaluar el modelo obtenido por MLR. ....	48
Tabla 4.6. Torque estabilizado y energía mecánica para los diferentes bionanocompuestos PHB-ATP/Arcilla. ....	51
Tabla 4.7. Rugosidad superficial para PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT. ....	57
Tabla 4.8. Temperatura de descomposición con diferentes porcentajes de pérdida de masas, obtenidas desde las curvas termogravimétricas. ....	59
Tabla 4.9. Propiedades térmicas obtenidas por DSC para los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT. ....	61



Tabla 4.10. Valores de transición vítrea obtenido por DMTA.....	62
Tabla 4.11. Valores del módulo elástico y dureza medida por nanoindentación para PHB, PHB-ATP y los bionanocompuestos de PHB-ATP/OMMT con concentraciones de 1 y 5% m/m de arcilla.....	62
Tabla 4.12. Número de experimentos realizados según el diseño de experimentos FFD con su respectiva respuesta de concentración de eugenol para los diferentes Bionanocompuestos.....	64
Tabla 4.13. Parámetros obtenidos para evaluar el modelo obtenido por MLR.....	65
Tabla 4.14. Resultados obtenidos por DSC y TGA para PHB, ATP y los diferentes bionanocompuestos con eugenol.....	73
Tabla 4.15. Rugosidad superficial y Rugosidad cuadrática media para PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT y PHB-ATP/OMMT/Eug. ....	79
Tabla 4.16. Propiedades mecánicas módulo elástico, resistencia a la tracción y a alargamiento a la rotura para ATP, PHB y los bionanocompuestos. ....	79
Tabla 4.17. Propiedades térmicas DCS y TGA para PHB, ATP y los diferentes bionanocompuestos. ....	88
Tabla 4.18. Concentración de eugenol en los bionanocompuestos obtenidos por extrusión y actividad antifúngica de las muestras con y sin eugenol.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución de materias primas en el mercado nacional, año 2013. Fuente ASIPLA. ....	2
Figura 1.2. Proporción de residuos post-consumo en la UE. <sup>4</sup> .....	3
Figura 1.3. Tipos y clasificación de polímeros biodegradables. <sup>8</sup> .....	5
Figura 1.4. Envase pasivo, interacción entorno-envase-producto. Fuente ITENE.....	7
Figura 1.5. Estructura de algunos componentes de aceites esenciales. <sup>28</sup> .....	10
Figura 1.6. Estructura general de silicatos laminares. <sup>47</sup> .....	12
Figura 1.7. Morfologías de las diferentes interacciones polímero-arcilla a)Tactoide (microcompuesto), b)Intercalado y c) Exfoliado (nanocompuestos). <sup>61</sup> .....	13
Figura 1.8. Ilustración esquemática de la tortuosidad producida por láminas de arcillas exfoliadas en una matriz polimérica. A) Bionanocompuesto exfoliado y b) polímero sin carga. <sup>65</sup> .....	14
Figura 1.9. Estructura de los polihidroxialcanoatos sintetizados por bacterias. <sup>85</sup> .....	16
Figura 1.10. a) Unidad repetitiva del Poli(3-hidroxi-butirato) y b) Unidad repetitiva del copolímero (polihidroxi-butirato- <i>co</i> -valerato). Fuente: elaboración propia. ....	17
Figura 1.11. Diseño de una estructura básica de almidón, a) unidades de glucosa, b) amilosa y c) amilopectina. <sup>96</sup> .....	19
Figura 3.1. a) Montmorillonita modificada con un 25-30% con metildihidroxi-etil amonio, b) Eugenol y c) Polihidroxi-butirato (PHB). Fuente: elaboración propia. ....	22
Figura 3.2. Etapas de procesamiento para obtención de ATP (mezcladora-extrusora-muestra de pellet ATP). Fuente: elaboración propia.....	23
Figura 3.3. Zonas de temperatura en la extrusora. Fuente: elaboración propia.....	24
Figura 3.4. Mezclador interno, Haake Rheomix. Fuente: elaboración propia.....	25
Figura 3.5. Curva típica de Carga-Desplazamiento en un ciclo de nanoindentación. <sup>111</sup> .....	28

Figura 3.6. Gráfica de absorbancia versus longitud de onda de una muestra de eugenol diluida en etanol. Fuente: elaboración propia.....	31
Figura 4.1. Espectros FT-IR para almidón y almidón termoplástico. Fuente: elaboración propia.....	33
Figura 4.2. Representación esquemática de los cambios estructurales del almidón bajo condiciones de procesamiento. <sup>115</sup> .....	34
Figura 4.3. Difractogramas para almidón de maíz y almidón/glicerina/agua en concentraciones masa/masa de 60/25/15 y 50/35/15. Fuente: elaboración propia.....	34
Figura 4.4. Microfotografías SEM para a) almidón nativo y b) Almidón termoplástico. Fuente: elaboración propia. ....	35
Figura 4.5. Coeficientes del polinomio obtenido para el Módulo elástico. Fuente: elaboración propia.....	38
Figura 4.6. Efectos de las variables sobre el módulo elástico. Módulo elástico versus a) Temperatura 1 (°C), b) Temperatura 2 (°C), c) Concentración ATP (% m/m). Fuente: elaboración propia. ....	39
Figura 4.7. Gráficas de contorno obtenidas por MLR a) Concentración ATP (% m/m) versus Temperatura de la zona 2 (°C), con la Temperatura de la zona 1 fija a 150 °C, b) Concentración ATP (% m/m) versus Temperatura de la zona 1 (°C), con la Temperatura de la zona 2 fija a 175 °C. Fuente: elaboración propia. ....	39
Figura 4.8. Espectros FT-IR para almidón termoplástico, PHB y mezcla de PHB/ATP a diferentes temperaturas y concentraciones. Fuente: elaboración propia.....	40
Figura 4.9. Análisis de elementos por SEM/EDS para PHB. Fuente: elaboración propia...	41
Figura 4.10. Difractograma para PHB y para la mezcla PHB-ATP (65-35 %m/m). Fuente: elaboración propia. ....	42
Figura 4.11. Microfotografías SEM para las mezclas PHB-ATP a) 60V_130-165(25%), b) 60V_150-165(25%), c) 60V_130-165(35%) y d) 60V_150-165(35%). Fuente: elaboración propia.....	43
Figura 4.12. Termogramas del segundo calentamiento, para PHB (–), las mezclas PHB-ATP(75:25) con T <sub>1</sub> de 130 °C (–), con T <sub>1</sub> de 150 °C (–), las mezclas PHB-ATP(65:35) con T <sub>1</sub> de 130 °C (–) y con T <sub>1</sub> de 150 °C (–). Velocidad 60 rpm y zona 2 con 165 °C. Fuente: elaboración propia. ....	44

Figura 4.13. a) Perfil de descomposición térmica y b) es la derivada de la pérdida de masa para el PHB, ATP y las mezclas PHB-ATP obtenidas a una velocidad de mezclado de 60 rpm y a diferentes temperaturas y concentraciones de ATP. Fuente: elaboración propia. ....	46
Figura 4.14. Reacción de degradación PHB. <sup>124</sup> .....	47
Figura 4.15. Coeficientes del polinomio obtenidos para el Módulo elástico. Fuente: elaboración propia. ....	49
Figura 4.16. Efecto de las variables sobre el módulo elástico, a) velocidad de mezclado y b) tiempo de mezclado. Fuente: elaboración propia. ....	49
Figura 4.17. Gráficos de interacciones para concentración de arcilla a) Tiempo y b) Velocidad para su efecto frente al módulo elástico. Fuente: elaboración propia. ....	50
Figura 4.18. Gráfico de contorno 2D con los valores predichos por el modelo estadístico RLM, a) concentración de arcilla (%m/m) versus Tiempo (min), con la velocidad fija a 80 rpm y b) concentración de arcilla (%m/m) versus Velocidad (rpm), con el tiempo fijo a 5 min. Fuente: elaboración propia. ....	50
Figura 4.19. Curva torque versus tiempo para el bionanocompuesto PHB-ATP/Arcilla (5 %m/m, 5 min y 80 rpm). Fuente: elaboración propia.....	51
Figura 4.20. a) Eliminación de Hofmann y b) ataque nucleofílico de un cloruro (contra ión). <sup>128</sup> .....	53
Figura 4.21. Difractogramas para la arcilla montmorillonita modificada (OMMT), PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos con 1 y 5 %m/m de arcilla. Fuente: elaboración propia.....	54
Figura 4.22. Microfotografías obtenidas por TEM para el bionanocompuesto con 5% masa de arcilla a) morfología exfoliada y b) morfología intercalada. Fuente: elaboración propia. ....	54
Figura 4.23. Microfotografía SEM de la superficie del bionanocompuesto a) PHB-ATP/1OMMT y b) PHB-ATP/5OMMT, las microfotografías c) y d) son cortes transversales a la película de los bionanocompuestos PHB-ATP/1OMMT y PHB-ATP/5OMMT respectivamente. La microfotografía e) es un aumento de la microfotografía d) y f) el almidón nativo. Fuente: elaboración propia. ....	56
Figura 4.24. Imagen topográfica 3D obtenida por microscopía de fuerza atómica para a)PHB, b) PHB-ATP, c) PHB-ATP/1_OMMT y d) PHB-ATP/5_OMMT. Fuente: elaboración propia.....	56

Figura 4.25. Perfil de descomposición y derivada del perfil de descomposición para PHB, ATP, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT con 1 y 5% m/m de arcilla. Fuente: elaboración propia. ....	58
Figura 4.26. Esquema de la afinidad de las moléculas de agua con las cadenas poliméricas. <sup>135</sup> .....	59
Figura 4.27. Termogramas del segundo calentamiento para PHB y para los bionanocompuesto PHB/ATP/Arcilla obtenidos a 80 rpm, 5 min y concentraciones de 1 y 5% m/m de arcilla. Fuente: elaboración propia.....	60
Figura 4.28. Ensayo previo para determinar la concentración mínima de inhibición de eugenol en el bionanocompuesto contra el hongo <i>Botrytis cinérea</i> , a) 1% en masa de eugenol, b) 2% en masa de eugenol y c) 3% en masa de eugenol. Fuente: elaboración propia. ....	64
Figura 4.29. Coeficientes del polinomio obtenidos con respecto a la concentración de eugenol en las películas de bionanocompuestos. Fuente: elaboración propia. ....	66
Figura 4.30. Gráficas de contorno obtenidas por RLM, para las variables concentración de eugenol (% m/m) y concentración de arcilla (% m/m). Fuente: elaboración propia.....	67
Figura 4.31. Difractogramas de los diferentes bionanocompuestos (velocidad en rpm, concentración en masa de eugenol, concentración en masa de arcilla ej: 60V3E1A) además de la arcilla y el PHB. Fuente: elaboración propia. ....	68
Figura 4.32. Microfotografías TEM para a)-b) bionanocompuesto 60V2E3A, c)-d) bionanocompuesto 70V2,5E2A, y e)- f) es el bionanocompuesto 60V3E1A. Fuente: elaboración propia. ....	69
Figura 4.33. Microfotografías SEM para a)-b) bionanocompuesto 60V2E3A, c)-d) bionanocompuesto 70V2,5E2A, y e)- f) es el bionanocompuesto 60V3E1A. Fuente: elaboración propia. ....	70
Figura 4.34. Termogramas del segundo calentamiento para PHB y los bionanocompuesto con diferente velocidad obtenida, concentración eugenol y concentración de arcilla. Fuente: elaboración propia. ....	71
Figura 4.35. Perfil de descomposición térmica para PHB, ATP y los bionanocompuestos con diferente velocidad obtenida, concentración eugenol y concentración de arcilla. Fuente: elaboración propia. ....	72

Figura 4.36. Difractograma para la arcilla (OMMT) (-), PHB (-), mezcla PHB-ATP (-), bionanocompuesto (-) y los bionanocompuestos con 2,5% (-) y 3% (-) en masa de eugenol. Fuente: elaboración propia. ....	74
Figura 4.37. Microfotografías TEM para b) PHB-ATP/OMMT (3%) c) y d) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%), e) y f) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%). Fuente: elaboración propia. ....	76
Figura 4.38. Imágenes SEM del corte transversal para a) PHB-ATP/OMMT (3%) b) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%) y c) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%). Fuente: elaboración propia. ....	77
Figura 4.39. Imágenes topográficas 3D y 2D obtenidas por AFM para a) PHB, b) PHB-ATP, C) PHB-ATP/OMMT(3%), d) PHB-ATP/OMMT(3%)/Eug (2,5%) y e) PHB-ATP/OMMT(3%)/Eug (3%). Fuente: elaboración propia. ....	78
Figura 4.40. Matriz de nanoindentaciones realizadas en PHB. Fuente: elaboración propia. ....	80
Figura 4.41. Curvas de indentaciones carga-desplazamiento para PHB, mezcla y bionanocompuesto con eugenol y sin eugenol. Fuente: elaboración propia. ....	81
Figura 4.42. a) Dureza para PHB, la mezcla PHB-ATP y los diferentes bionanocompuestos y b) módulo elástico obtenido por nanoindentación para PHB, la mezcla PHB-ATP y los diferentes bionanocompuestos. Fuente: elaboración propia. ....	82
Figura 4.43. Variación del módulo de almacenamiento con la temperatura. Fuente: elaboración propia. ....	84
Figura 4.44. Variación del módulo de pérdida con la temperatura. Fuente: elaboración propia. ....	85
Figura 4.45. Tan delta como función de la temperatura. Fuente: elaboración propia. ....	86
Figura 4.46. Perfil de descomposición térmica para ATP, PHB y PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%). Fuente: elaboración propia. ....	87
Figura 4.47. Termogramas DSC. Segundo calentamiento para PHB y PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) . Fuente: elaboración propia. ....	88
Figura 4.48. Eliminación de radicales libres (DPPH) para PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug	

(3%) . El PHB es la muestra control y el ácido ascórbico el control positivo. Fuente: elaboración propia. .... 90

Figura 4.49. Posible mecanismo para la reacción entre eugenol y DPPH•.<sup>163</sup> ..... 91

Figura 4.50. Actividad antifúngica contra *Botrytis cinérea* para a) PHB b)PHB-ATP c)PHB-ATP/OMMT (3%) d) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%) y d) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%) después de 7 días. Fuente: elaboración propia. .... 92

Figura 4.51. Fotografías de las diferentes muestras luego de ser extraídas del compost a diferentes días. Fuente: elaboración propia. .... 95

Figura 4.52. Porcentaje de desintegración de las diferentes películas bajo condiciones de compostaje en función del tiempo. Fuente: elaboración propia. .... 96



## RESUMEN

Según *Plastics Europe* la producción mundial de plástico en el 2016 fue de 335 millones de toneladas y aumenta cada año. La industria del envase es una de las que posee el mayor consumo de plástico (40%) y al mismo tiempo es la que genera más residuos ya que se enfoca en usos de cortos periodos de tiempo. Por lo tanto, se hace necesario desarrollar nuevos materiales, que no solo den la posibilidad de ser 100% biodegradables, sino que, además, permitan ofrecer un material para la producción de envases activos, los que tienen como fin proteger e interactuar con los alimentos, para ampliar su vida útil. El objetivo principal de esta investigación fue la obtención y caracterización de bionanocompuestos de polihidroxibutirato (PHB)- almidón termoplástico (ATP) con actividad antimicrobiana y antioxidante, otorgada por aceites esenciales (eugenol), con el fin de generar un material para su posible aplicación en envases de alimentos ya que dificultaría la acción de microorganismos y evitaría la oxidación de los alimentos.

Los bionanocompuestos de PHB, almidón de maíz plastificado con glicerina y agua (ATP), arcilla montmorillonita órgano-modificada (OMMT) y Eugenol fueron obtenidos por mezclado en estado fundido. Para obtener los bionanocompuestos con actividad antimicrobiana y antioxidante, primero se fijó la relación PHB-ATP en 65:35 respectivamente, ya que esta presentó las mejores propiedades mecánicas, térmicas y morfológicas. Segundo se obtuvo los bionanocompuesto, los cuales fueron caracterizados por DRX, TEM, AFM, SEM, DSC, TGA y nanoindentación. Por DRX y TEM se determinó que los bionanocompuestos presentan una morfología intercalada-exfoliada. La dureza y el módulo elástico (nanoindentación) de los bionanocompuestos presentan valores similares a los del PHB contrarrestando la disminución que presenta la mezcla de polímeros PHB-ATP. Las propiedades térmicas no presentan cambios significativos, solo el grado de cristalinidad presentó una disminución con el aumento del contenido de arcilla.

Finalmente, se obtuvo los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT/Eugenol. Se determinó que la temperatura de descomposición no presentó cambios significativos con la presencia de eugenol, pero si la temperatura de fusión disminuyó aproximadamente 10 °C y la cristalinidad aumentó con respecto a la del PHB. El módulo elástico de los bionanocompuesto aumentó un 12% y el de la mezcla PHB-ATP disminuyó un 25% con respecto al del PHB, el eugenol no afecta significativamente las propiedades mecánicas. Los bioanocompuestos con eugenol presentaron actividad antifúngica contra *Botrytis cinérea* y actividad antioxidante, obteniéndose altos porcentajes de eliminación de radicales DPPH. El ensayo de degradación mostró que en el día 42 la mezcla PHB-ATP y todos los bionanocompuestos presentaron un 90% de desintegración en el compost.



## ABSTRACT

Currently, plastic production is 335 million tons and is growing steadily. Packaging industry has the highest consumption of plastic (40%). Also, it is the industry that generates more waste, since its applications are for short time periods. Thus, it is necessary to obtain new materials, that also from being 100% biodegradable can be use as materials for active packaging, which besides to protect the product would aid extending food shelf life. The main objective of this research was to obtain and characterize polyhydroxybutyrate (PHB)-thermoplastic starch (TPS) bionanocomposites with antimicrobial and antioxidant activity, granted by essential oils (eugenol), for possible application in food packaging, because this material would difficult the action of microorganisms and could avoid oxidation of food.

The bionanocomposites of PHB, water and glycerol plasticized corn starch (TPS), organomodified montmorillonite (OMMT) and Eugenol were obtained by melt blending. To obtain the bionanocomposites with antimicrobial and antioxidant properties, first the PHB-ATP ratio was determined in 65:35 respectively, since presented the best mechanical, thermal and morphological properties. Secondly was obtained bionanocomposites which were characterized by XRD, TEM, AFM, SEM, DSC, TGA and nanoindentation. The XRD and TEM micrographs indicated that the morphology of the bionanocomposites were intercalated-exfoliated. The hardness and elastic moduli (nanoindentation) of bionanocomposites have values similar to those of PHB, improving the decrease of the PHB-TPS blends (65:35 weight ratio). The thermal properties do not present significant changes, and only the degree of crystallinity decreased with increasing clay content.

Finally, the bionanocomposites PHB-ATP / OMMT / Eugenol were obtained. It was determined that the presence of eugenol did not affect the decomposition temperature of PHB, but if the melting temperature decreased by approximately 10 °C and the degree of crystallinity increased with respect to PHB. Tensile test indicated that the elastic modulus decreased by 25% for the PHB-TPS (65:35) blend, while for the PHB-TPS (65:35)/OMMT bionanocomposites increased by 12%, compare to pure PHB. Bionanocomposites with eugenol exhibited antifungal activity against *Botrytis cinerea* and antioxidant activity, as indicated by high percentages of (DPPH) radical removal. The disintegration study showed that on day 42 the PHB-ATP blend and all bionanocomposites presented a 90% disintegration in compost

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Residuos de plásticos

Hace más de medio siglo los polímeros sintéticos han venido a reemplazar a otros materiales como metales, madera, vidrio y cartón, esto debido a su gran versatilidad, buenas propiedades físicas, excelente barrera, facilidad para su fabricación<sup>1</sup> y su bajo costo de producción. Los más utilizados son los polímeros termoplásticos y termoestables. Los polímeros termoplásticos, al ser expuestos al calor se funden y son endurecidos con frío, este ciclo se puede aplicar varias veces. Por otra parte, los termoestables sufren un cambio químico cuando se calienta, creando una red tridimensional. Después de calentarse y moldearse, estos polímeros no pueden volver a fundirse y reformarse. Ambos tipos de polímeros son conocidos como plásticos, palabra derivada del latín “plastikos” que significa capaz de ser moldeado en diferentes formas. Los plásticos más utilizados se muestran en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Ejemplos de los tipos de plásticos más utilizados, los que fueron clasificados en Termoplásticos y Termoestables.

Termoplásticos	Termoestables
Polietileno de baja y alta densidad (PEBD, PEAD)	Poliuretano (PUR)
Polipropileno (PP)	Silicona
Poliestireno (PS)	Resinas Epoxi
Policloruro de vinilo (PVC)	Resinas Acrílicas
Policarbonato (PC)	Urea-Formaldehido
Polietileno tereftalato (PET)	Resina Melamina
Polieteretercetona (PEEK)	Resina fenólica

En la actualidad los plásticos se encuentran en diferentes áreas tales como vestimenta, electrónica, construcción, automóviles, envases, artículos del hogar, entre otras innumerables aplicaciones. Por esta razón se han convertido en una parte indispensable en nuestras vidas y el motivo por el cual su producción aumenta cada año.

En el 2016 la producción mundial fue aproximadamente de 335 millones de toneladas según el último reporte de la “*Association of Plastics Manufactures*”. Los sectores que más demanda tuvieron en Europa fue la industria de los envases con un 40%, el área de la construcción con un 20% y el área de los artículos del hogar, deporte, salud y seguridad<sup>2</sup> con un 17%, estas tres áreas son las que más plásticos consumen.

Al analizar el consumo de plástico a nivel nacional, se observa que la tendencia es la misma que en Europa. En los datos nacionales del año 2013 el consumo aparente de plásticos fue de 901.942 toneladas de las cuales un 48% fue destinado en la industria del envase. La diferencia que tenemos con Europa es la demanda de algunos tipos de polímeros. En Europa se utiliza un 19% de polipropileno seguido por el PEBD con un 17% y PEAD con un 12%, pero a nivel nacional existe una demanda del 25% y 21% para PEAD, PEBD respectivamente y el polipropileno con 13%, como lo muestra la figura 1.1.

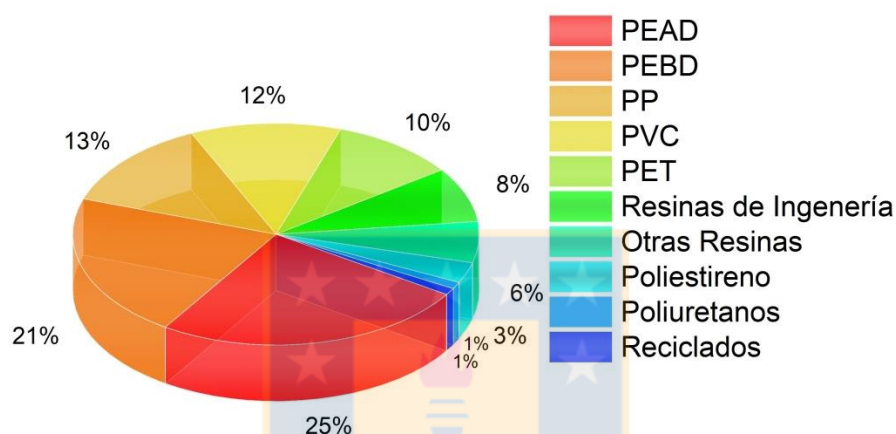


Figura 1.1. Distribución de materias primas en el mercado nacional, año 2013. Fuente ASIPLA.

Si bien los plásticos han mejorado la calidad de vida por sus innumerables aplicaciones (construcción, hogar, textil, agricultura entre otros), estos presentan algunas desventajas: son obtenidos desde recurso no renovable (petróleo), cuando son desechados liberan los aditivos que los componen los cuales pueden ser tóxicos (bisfenol A). Además, los plásticos tardan años en ser degradados, ya que las mismas características que lo hacen ser un buen material, los hacen resistentes a diferentes factores tales como temperatura, presión, disolventes químicos, luz UV, entre otros. Esta alta resistencia conduce a que se produzcan grandes acumulaciones de residuos plásticos,<sup>3</sup> lo que conlleva a problemas medio ambientales a corto y largo plazo.

Una de las áreas que produce el mayor aporte de residuos plásticos es el área de los envases, ya que estos se utilizan por periodos de tiempo relativamente cortos a diferencia de otras aplicaciones, tal como lo muestra la figura 1.2.

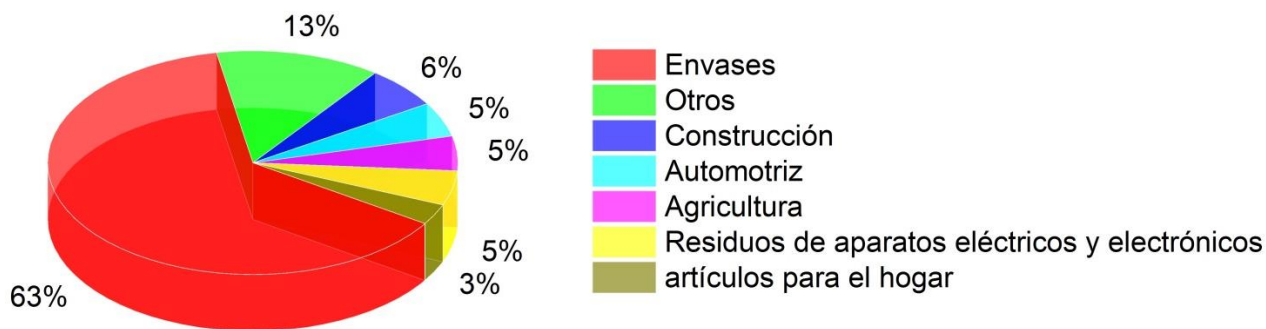


Figura 1.2. Proporción de residuos post-consumo en la UE.<sup>4</sup>

La gran preocupación en la actualidad es que la mayor parte de los desechos terminan en el medio ambiente, generando un impacto negativo, que se ve reflejado en el medio marino, ya que se altera el ecosistema acuático afectando la vida de las diferentes especies. Hasta el momento el efecto en la salud de los seres humanos es incierto ya que no se conoce claramente que tan expuesto estamos a los desechos de plásticos. Si se ha determinado que los aditivos como bisfenol A, ftalatos y retardantes de llamas que se utilizan para mejorar algunas propiedades de los polímeros termoplástico o termoestables, tienen efectos negativos en la salud humana y animal, perjudicando principalmente al sistema endocrino.<sup>5</sup>

Para poder contrarrestar la actual situación medio ambiental producida existen varias posibles “soluciones” que consisten en reducir, reutilizar y reciclar. Para este propósito existen diferentes campañas como, por ejemplo, la eliminación de bolsas plásticas utilizadas a nivel comercial. En España con el fin de reutilizar los materiales plásticos se ha diseñado el proyecto POLYMIX, que produce asfaltos cuya composición posee neumáticos fuera de uso, tapones de polipropileno, envases de polietileno y perchas de poliestireno. Estas mezclas asfálticas presentan mejores propiedades físicas y mecánicas que las convencionales.<sup>6</sup>

Con respecto al reciclaje, este se fundamenta en que los plásticos pueden ser reciclados sin perder sus propiedades originales. Las complejidades que presenta el reciclaje es el alto costos de recogida, gestionar adecuadamente los residuos y finalmente porque se ha comprobado que por cada proceso de reciclaje los materiales van aumentando su fragilidad. Hay que considerar que si se desea que el material reciclado sea utilizado en envases de alimentos debe tener la pureza adecuada para evitar la migración de sustancias indeseadas al alimento.

En Chile aún no existe una cultura de reciclaje por lo que solo se recicla el 10% de los residuos generados y de esto un 1,3% aproximadamente corresponde a plásticos, según datos del Ministerio del medio ambiente. Con el fin de avanzar en el tema de reciclaje en mayo de 2016 en Chile se aprobó la Ley REP (Reciclaje y Responsabilidad Extendida del Productor) con esta ley se pretende ver al reciclaje como una industria, tal como lo hace la empresa Comberplast dedicada a valorizar los residuos, ya que son la materia prima de todos sus productos. Una de sus líneas de producción es la de cajas plástica de bebidas, las cuales recicla para volver obtener las mismas. Otra de sus líneas es la de recolectar las redes de pesca y las cuerdas (cabos) con los cuales obtienen artículos del hogar, ocio entre otros.

Si bien con el paso del tiempo se ha ido avanzando en tener una conciencia ambiental en el uso de plástico, se debe tener presente que el plástico es un material versátil con millones de aplicaciones por lo que no se puede considerar no utilizarlo. Por lo tanto, los avances en esta área deberían enfocarse en mejorar la calidad de los materiales, facilitar su reciclaje (debido a que algunos productos poseen combinaciones de polímeros), comenzar a utilizar polímeros biodegradables (para disminuir problemas como la acumulación de desechos) y cambiar la fuente de obtención a una renovable.

## **1.2 Polímeros Biodegradables**

En la actualidad se utilizan varios conceptos para definir un material que es capaz de descomponerse, tales como:gradable que corresponde cuando el polímero se fragmenta en partículas diminutas. Este concepto engloba materiales poliméricos foto-degradables (rayos ultravioleta comienzan la degradación) y oxo-degradables (degradación por oxidación activada por luz, calor o tensión mecánica). De acuerdo con la norma ASTM D6400 compostable corresponde a un material polimérico que se descompone en dióxido de carbono, agua, metano y biomasa a la misma velocidad que el resto de materia orgánica, sin dejar residuos tóxicos visibles o distinguibles. Finalmente el término biodegradable se define como un material polimérico capaz de degradarse por la acción de microorganismos de origen natural tales como bacterias, hongos y algas a través de la acción de enzimas y / o por descomposición química (ASTM D6400).<sup>7</sup> Se debe tener presente que la biodegradabilidad se relaciona con la estructura del polímero y no con su origen.

Los polímeros biodegradables (ver figura 1.3) se clasifican de dos formas, los biopolímeros de origen natural o los polímeros sintéticos biodegradables (poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(butilen-succinato), poli(butilen-adipato-*co*-tereftalato), poli(vinil alcohol)). Las ventajas de los biopolímeros frente a los polímeros sintéticos son que

se producen a partir de fuentes renovables tales como almidón de maíz, almidón de yuca, celulosa, la mayoría provenientes de recursos agrícolas y que son completamente degradables en productos como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y en abonos orgánicos.

Según la obtención de estos materiales se clasifican en: *Polímeros extraídos o removidos directamente de la biomasa* (almidón, celulosa, quitina, colágeno, caseína). *Polímeros producidos por síntesis química* clásica utilizando monómeros biológicos de fuentes renovables (ácido poliláctico). *Polímeros producidos por microorganismos*, bacterias productoras nativas o modificadas genéticamente (polihidroxibutirato, polihidroxibutirato-valerato). Por lo tanto, al ser todos de origen biológico son biodegradables o compostables<sup>3</sup> y representan una ruta alternativa a los polímeros no-biodegradables.

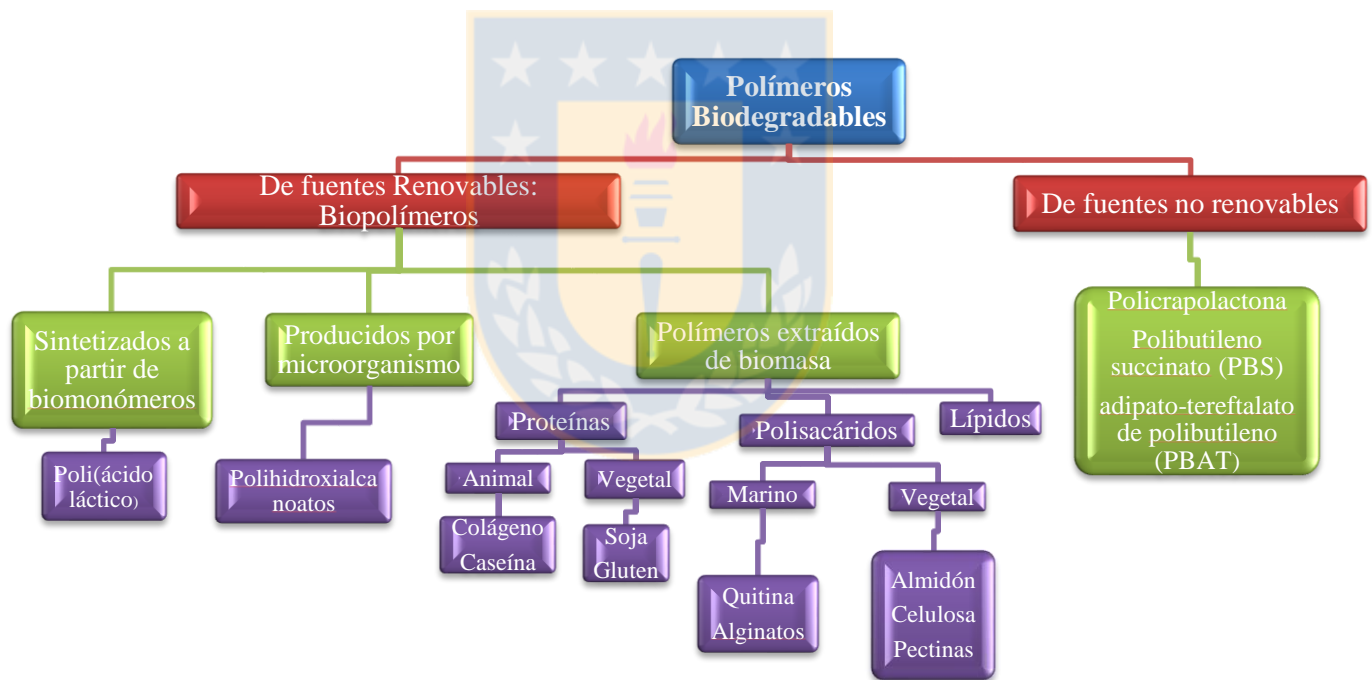


Figura 1.3. Tipos y clasificación de polímeros biodegradables.<sup>8</sup>

Según la institución “European Bioplastics” los bioplástico representan alrededor del uno por ciento de la producción anual de plástico<sup>9</sup> (2017) y se espera que cada año su porcentaje aumente. Los principales impulsores del crecimiento de bioplástico son el

ácido poliláctico y los polihidroxicanoatos, los cuales presentan una amplia gama de propiedades físicas y mecánicas. Estos polímeros se proyectan para reemplazar a polímeros sintéticos como el polipropileno, poliestireno.

La aplicación de bioplásticos podría solucionar el problema de los plásticos de raíz ya que se consigue cambiar la fuente de obtención y evitar la acumulación de desechos. Para poder potencializar el uso de los biopolímeros en la industria del plástico es necesario mejorar propiedades tales como su fragilidad, alta permeabilidad a los gases, baja viscosidad en fundido para su posterior procesamiento, entre otras. Estas desventajas son las que restringen sus aplicaciones, por lo tanto, se busca mejorar sus propiedades para igualarlas a las de los polímeros sintéticos. Por este motivo se están desarrollando variadas líneas de investigación, las cuales hasta ahora se han enfocado en mezclar biopolímeros o en nanoreforzarlos (nanocompuesto). Esta última posibilidad ha demostrado ser la forma más efectiva.<sup>10</sup>

Al mejorar las desventajas de los biopolímeros estos lograrían reemplazar a los polímeros sintéticos en aplicaciones de periodos de tiempo corto como bolsas, platos, utensilios y vasos desechables, material clínico, pero principalmente en envases.

### **1.3 Envases activos.**

La industria del envase abarca el 48%<sup>11</sup> en Chile y un 39,9% a nivel mundial, por esta razón la importancia de enfocarse en esta industria, desarrollando materiales biodegradables. Los envases para alimentos hace algunos años solo se preocupaba de contener y proteger el alimento (envase pasivo, ver figura 1.4) de las influencias ambientales que causan su deterioro, tales como el calor, la luz, la presencia o ausencia de humedad, el oxígeno, los microorganismos, insectos entre otros.

Hace algunos años se están desarrollando envases que además de proteger el alimento interactúan con el, para prolongar su vida útil, calidad e inocuidad (envase activo) mediante propiedades antioxidante o antimicrobianas.<sup>12</sup> Por otra parte un envase que entrega alguna información sobre el alimento (pH, temperatura, frescura) se le denomina envase inteligente.

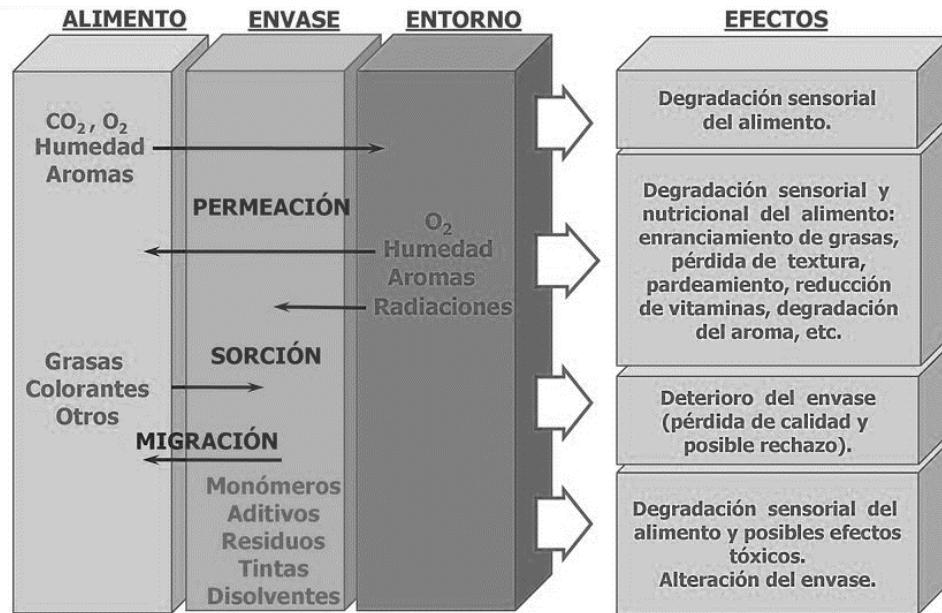


Figura 1.4. Envase pasivo, interacción entorno-envase-producto. Fuente ITENE

Un envase activo es una opción a los tipos de conservantes que se utilizan en la industria alimentaria (dióxido de carbono, ozono, lactato de sodio, dióxido de azufre). Según los reglamentos 1935/2004/CE y 450/2009/CE de la unión europea se consideran envases activos: "materiales y objetos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados". De tal forma que los materiales para envases activos están diseñados para incorporar componentes que liberarán sustancias hacia el alimento o absorberán sustancias liberadas por el alimento.<sup>13</sup> En general, los envases activos proporcionan varias funciones que no existen en los sistemas de envasado convencionales, tales como controlar la permeación de algunos gases (dióxido de carbono, oxígeno y etileno), poseer actividad antimicrobiana o antioxidante, contener absorbedores de humedad, olores, entre otros.<sup>14</sup>

La ventaja de los envases activos en comparación con la adición directa de sustancias activas es que se utilizan menores cantidades de estas. La migración del principio activo ocurre desde el envase al alimento (que podría ser utilizado para proporcionar efectos de protección por tiempos más prolongados), actuando desde la superficie. Con este tipo de envase se evita exponer al alimento a procesos para evitar su deterioro, como por ejemplo secado, congelación, refrigeración o irradiación.<sup>15</sup>

Un prototipo prometedor de envase activo es aquel que tiene incorporado agentes antimicrobianos en el material, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos tales



como hongos o bacterias, evitando así el deterioro de los alimentos. El principal microorganismo que ataca a las frutas blandas es el hongo *Botrytis cinérea* (moho gris) y en el caso de las carnes comúnmente son atacadas por bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*.

Para combatir la proliferación de microorganismos se emplean diferentes agentes antimicrobianos como lisozima o nisina, cuya liberación se ha estudiado en envases multicapas (polietileno/poliamida/polietileno).<sup>16</sup> Otros tipos de antimicrobianos son los aceites esenciales, que se extraen de diferentes tipos de especias o hierbas, las que están catalogados como GRAS “*generally recognized as safe*” (generalmente reconocidos como seguros) por la FDA en Estados Unidos. Estos compuestos están reemplazando a los compuestos sintéticos utilizados como antimicrobianos y antioxidantes en la industria alimentaria, ya que el uso de compuestos sintéticos tales como benzoato de sodio, ácido sórbico (antimicrobianos),<sup>17</sup> n-butil hidroxitolueno, hidroxibutilanisol (antioxidantes)<sup>18</sup> han sido restringidos debido a sus posibles efectos tóxicos o carcinógenos.

Otro tipo de envase activo es aquel que contiene agentes antioxidantes en el material y están destinados para productos alimenticios que contienen ácidos grasos insaturados. Los agentes antioxidantes inhiben la oxidación de los productos alimenticios que contienen lípidos, que es un factor importante, ya que limita la vida útil del producto. La oxidación es una reacción en cadena, es decir, una vez iniciada, la reacción acelera la oxidación de sustancias sensibles. Los hidroperóxidos (productos de oxidación primaria) se forman cuando el oxígeno molecular y los ácidos grasos insaturados se combinan en presencia de un catalizador, tal como hierro, cobre, enzimas, calor, luz, entre otros, durante la etapa inicial. Estos compuestos de peróxido son reactivos y se pueden combinar con las grasas para formar productos reactivos adicionales durante la fase de auto-oxidación. Productos de oxidación secundarios, alcanos, alquenos, aldehídos y cetonas, se forman durante la etapa final. Estos compuestos son volátiles y son los responsables del olor rancio característico de carnes o pescados.<sup>18</sup> La industria alimentaria ha utilizado como agentes antioxidantes compuestos sintéticos, tales como hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado,<sup>19</sup> galato de propilo, hidroquinona de tert-butilo y palmitato de ascorbilo, algunos de los cuales podrían tener efectos en la salud, por esta razón se comienzan a utilizar compuestos obtenidos de productos naturales.

En la actualidad se están utilizando productos naturales como agentes antioxidantes o antimicrobianos para la fabricación de envases activos. En el caso de los agentes antioxidantes se ha reportado que en los extractos del té verde se encuentran las catequinas, que son flavonoides que presentan una actividad antioxidante bien conocida debido al grupo catecol (orto dihidroxibenceno) presente en su estructura. Lopez Dicastillo y colaboradores analizaron la capacidad antioxidante del ácido ascórbico (vitamina C), el ácido ferúlico (componente lignocelulósico) y el té verde, incorporados en Etilen-Vinil-Alcohol (EVOH) determinando que los componentes otorgan sus propiedades antioxidantes al EVOH, al mantener la estabilidad del producto envasado (sardina), siendo la catequina quien presentó una mayor protección contra la oxidación de lípidos.<sup>20</sup>

Otro antioxidante que destaca es el  $\alpha$ -tocoferol, es muy poco soluble en agua y presenta una mayor solubilidad en aceites, se encuentra presente en la vitamina E y es el más activo biológicamente de los diferentes tocoferoles ( $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), es considerado un antioxidante muy eficaz que protege a la membrana celular de los ataques de radicales peróxido y especies de nitrógeno mutagénicos.<sup>21</sup> Se ha estudiado su efecto en envases multicapa de polietileno de alta densidad/ Etilen-Vinil-Alcohol /polietileno de baja densidad, donde se observó que la migración de  $\alpha$ -tocoferol retrasa la oxidación de lípidos.<sup>22</sup>

Si bien todos los compuestos descritos presentan actividad antioxidante cuando son incorporados en una matriz polimérica, existe la desventaja de que solo cumplen el rol de ser antioxidante. Existe otra línea de compuestos naturales denominados aceites esenciales, lo cuales además de su actividad antioxidante también presentan actividad antimicrobiana, por lo que su uso evitaría la incorporación de varios compuestos en el material.

Los componentes de aceites esenciales (ver figura 1.5) se han utilizado desde la antigüedad como perfumes, saborizantes y conservantes, se extraen de plantas como el orégano, canela, clavo de olor, cilantro, romero entre otras. Para los diferentes aceites esenciales se ha comprobado su actividad antioxidante mediante el seguimiento de la formación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)<sup>23</sup> en el cual destacaron el carvacrol, timol y eugenol, para este último también se ha comprobado su capacidad antioxidante con diferentes métodos como el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis)-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), CUPRAC (Capacidad antioxidante reductor de ion cúprico).<sup>24,25,26</sup> En el caso de eugenol se ha comprobado que mantiene su capacidad antioxidante cuando

es incorporado en matrices poliméricas como polietileno lineal de baja densidad<sup>26</sup> o en nanopartículas de quitosano.<sup>27</sup>

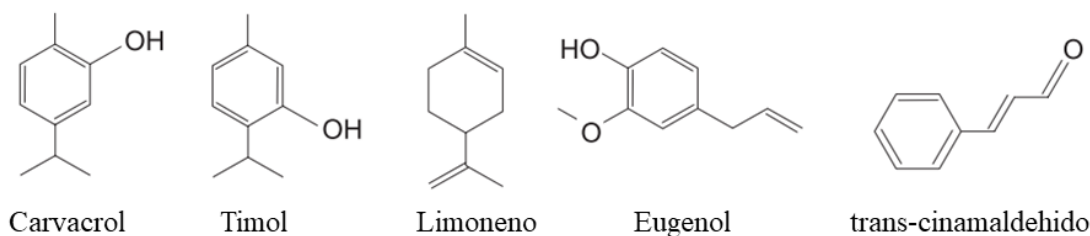


Figura 1.5. Estructura de algunos componentes de aceites esenciales.<sup>28</sup>

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, ha sido analizada frente a diferentes bacterias tales como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*.<sup>29,30</sup> De los diferentes tipos de aceites esenciales (cinamaldehído, limoneno, mentol) los más estudiados en matrices poliméricas son el carvacrol y el timol (extraídos del orégano y del tomillo), estos presentan buenas propiedades antibacterianas y antifúngicas. Sus propiedades se mantienen al ser incorporados a las matrices poliméricas como polietileno o polipropileno.<sup>31,32,33</sup> El mecanismo por el cual estos componentes de aceites esenciales inhiben el crecimiento de microorganismos no se ha definido completamente,<sup>34</sup> solo se tienen antecedentes de que produciría alteraciones en la membrana citoplasmática de las bacterias,<sup>35</sup> lo que conduciría a la muerte celular.<sup>36</sup>

Otros aceites esenciales son el cinamaldehído, limoneno y eugenol que si bien se conocen sus propiedades antibacterianas estas no han sido ampliamente estudiadas en matrices poliméricas. El eugenol, 2-metoxi-4-(2-propenil) fenol, es uno de los aceites esenciales más utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y odontológica, por sus propiedades antibacterianas, las cuales se han comprobado frente a un amplio espectro de bacterias tanto gram-negativa como gram-positiva,<sup>29</sup> sus propiedades antifúngicas las que se han analizado contra *Fusarium verticillioides* (que afecta al maíz)<sup>37</sup> y contra el crecimiento de levadura y moho en uva de mesa.<sup>38</sup> El eugenol es extraído especialmente del clavo de olor, nuez moscada y canela, su punto de ebullición es de aproximadamente 254 °C lo que permitiría ser procesado con polímeros sintéticos y biopolímeros como el PHB y PLA, ya que sus temperaturas de fusión son menores a 200 °C.

La eficacia de los agentes antimicrobianos y antioxidantes depende en parte a la velocidad de liberación de los compuestos. Si la liberación es demasiado lenta no hay

una actividad suficiente por tanto hay crecimiento microbiano u oxidación; si la liberación es demasiado rápida la actividad no es suficiente para lograr aumentar la vida útil del producto.<sup>39</sup> Para poder controlar este fenómeno se han aplicado diferentes técnicas como es envases multicapa, *electrospinning*, por revestimiento superficial<sup>30</sup> y por nanocompuestos poliméricos. Los nanocompuestos son una clase de materiales híbridos nanoestructurados formados por la combinación de una matriz que puede ser un polímero biodegradable de recursos naturales (bionanocompuesto) o de un polímero sintético (nanocompuesto).

La obtención de envases activos antimicrobianos y antioxidantes es una tecnología desafiante con un impacto directo en la extensión de la vida útil de los alimentos, ya que permitiría obtener un alimento fresco por más tiempo y por lo tanto, haría posible hacer exportaciones que conlleven un mayor tiempo de transporte.

#### **1.4 Bionanocompuestos poliméricos**

Un nanocompuesto polimérico es un material que posee dos o más componentes, una matriz (polímero sintético o biodegradable), un nanorelleno el cual se encuentra en un rango entre 1 y 100 nm en alguna de sus tres dimensiones<sup>40</sup> y un agente de refuerzo (agente compatibilizante polímero-nanorelleno entre otros). Un bionanocompuesto es aquel que posee una matriz biodegradable como por ejemplo: celulosa, carboximetilcelulosa, almidón, ácido poliláctico (PLA), polihidroxibutirato (PHB), polihidroxibutirato-valerato (PHBV), poli(ácido glicólico) (PGA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(succinato de butileno) (PBS), poli (alcohol vinílico) (PVA) entre otros.

El nanorelleno de los bionanocompuestos idealmente debe ser de recursos renovables para tener un material completamente amigable con el medio ambiente. En este contexto se puede trabajar con 3 tipos diferentes de nanorellenos: a base de celulosa (nanocristales y nanofibras), nanotubos de carbono y arcillas.<sup>41</sup> Los nanocristales y las nanofibras de celulosa, presentan una alta absorción de humedad y es incompatible con algunas matrices poliméricas, lo que no permite su dispersión. Su temperatura de degradación es cercana a los 220 °C, esto dificulta su obtención con polímeros que tienen un alto punto de fusión. Por otra parte si las nanofibras de celulosa están bien orientadas se mejoran notablemente las propiedades mecánicas del polímero.<sup>42,43</sup>

Los nanotubos de carbono han sido utilizados como rellenos funcionales de alto rendimiento, que no sólo mejoran el rendimiento térmico / mecánico del material polimérico, sino también proporcionan funcionalidades adicionales como retardante

de fuego, resistencia a la humedad y protección electromagnética.<sup>44</sup> Un punto crítico en la obtención de bionanocompuestos con nanotubos de carbono es su dispersión en la matriz polimérica. Como los nanotubos de carbono tienen tendencia a formar aglomeración y permanecer empaquetados debido a su alta relación de aspecto y fuertes interacciones de van der Waals,<sup>44</sup> se deben funcionalizar.

Otro tipo de nanorelleno son las arcillas, con una gran área de superficie, más de 700 m<sup>2</sup>/g, es decir, una gran interfaz para interactuar con el polímero (matriz). La más utilizada es la montmorillonita un filosilicato laminar, que presenta una estructura del tipo 2:1 (trilaminar), o sea presenta 2 capas tetraédricas con un ion central de silicio y una capa octaédrica que presenta un ion central de aluminio<sup>45</sup> (ver figura 1.6). La montmorillonita posee una elevada capacidad de intercambio catiónico<sup>46</sup> (80-200 meq/100g), lo que le permite ser fácilmente modificada con el fin de cambiar su naturaleza hidrofílica a hidrofóbica. El catión hidratado (Na<sup>+</sup>) localizado en la galería, puede ser intercambiado por otros de igual carga con un mayor tamaño, como por ejemplo un surfactante catiónicos.

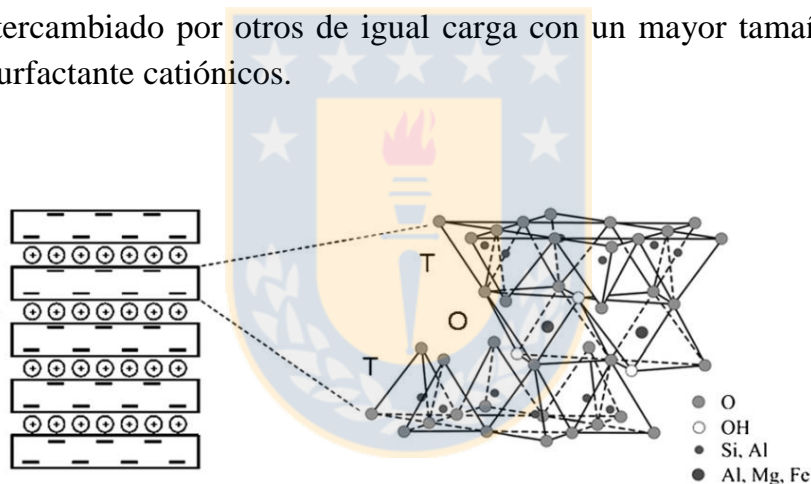


Figura 1.6. Estructura general de silicatos laminares.<sup>47</sup>

Las ventajas de las arcillas es su bajo costo, su alta estabilidad<sup>48</sup> y en bajas concentraciones son capaces de mejorar las propiedades mecánicas (módulo de elasticidad, resistencia a la tracción), térmicas (temperatura e fusión, cristalinidad, temperatura de descomposición) y de barrera (permeabilidad al oxígeno, permeabilidad al vapor de agua)<sup>49,50,51,52</sup> de los polímeros.

Con la obtención de nanocompuestos se ha logrado disminuir entre 30 y 40% la permeabilidad al oxígeno en nanocompuestos de LLDPE/montmorillonita con concentraciones entre 5 y 7% en masa.<sup>53</sup> Por otra parte Lotti y colaboradores,<sup>54</sup> obtuvieron una disminución de un 60% para los nanocompuestos HDPE/Cloisite 20A con 5% en peso de arcilla. Principalmente las arcillas permiten incorporar agentes

antimicrobianos<sup>10,32,34,57</sup> o antioxidantes,<sup>58,59</sup> los que mantienen sus buenas propiedades, además los nanocompuestos retrasan su rápida liberación.<sup>34,60</sup>

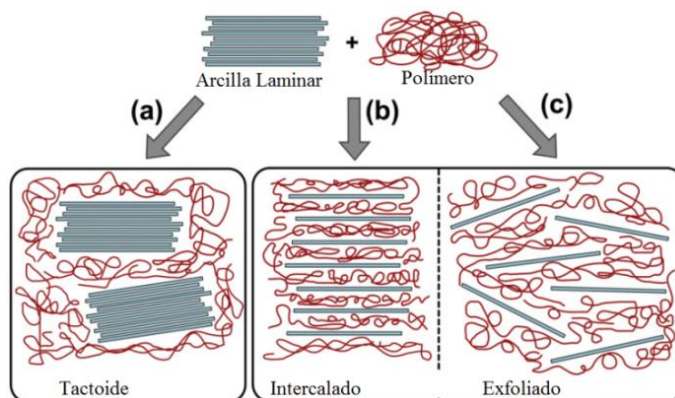


Figura 1.7. Morfologías de las diferentes interacciones polímero-arcilla a) Tactoide (microcompuesto), b) Intercalado y c) Exfoliado (nanocompuestos).<sup>61</sup>

Los nanocompuestos pueden ser obtenidos por tres técnicas diferentes, mezclado en solución, polimerización *in situ* o mezclado en estado fundido. Esta última no utiliza disolventes y se lleva a cabo en una mezcladora o en un extrusora, son equipos utilizados ampliamente por las industrias del plástico, por lo tanto, permite un rápido escalamiento a nivel industrial. Dependiendo del método de obtención y de la interacción de la matriz con la carga, se pueden obtener tres tipos de morfologías<sup>62</sup> las cuales se muestran en la figura 1.7 donde a) es la morfología tactoide, en que las cadenas poliméricas no son capaces de romper la estructura laminar del silicato, y por lo tanto el polímero sólo rodea la estructura laminar. b) morfología intercalada, en que el polímero se inserta entre las capas de estructura laminar del silicato, pero mantiene el orden paralelo de la estructura laminar y como consecuencia aumenta el espacio basal. c) morfología exfoliada, el polímero consigue dispersar completamente las láminas de arcilla, de tal forma que no existe interacción entre las láminas de silicato.

Que se presente una u otra morfología es trascendental ya que estas determinan mayoritariamente las propiedades mecánicas (resistencia al impacto, rigidez), térmicas y de barrera (permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono, vapor de agua).<sup>63</sup>

Un bionanocompuesto con una morfología exfoliada presentará una mayor tortuosidad, que es una propiedad importante si se quiere controlar la liberación del principio activo. La morfología exfoliada se ha comprobado que disminuye la permeabilidad al oxígeno, como consecuencia de que las moléculas deben rodear las capas de arcilla lo que dificulta su permeabilidad<sup>64</sup> (ver Figura 1.8). Es este fenómeno que permite una liberación más controlada de componentes que se encuentren en el

bionanocompuesto, así por ejemplo los aceites esenciales experimentan una liberación más lenta y con una mayor prolongación en el tiempo. Algunos estudios han determinado que para una liberación más lenta del aceite esencial se deben utilizar altas concentraciones de arcilla, así el principio activo se libera paulatinamente.<sup>34,33</sup>

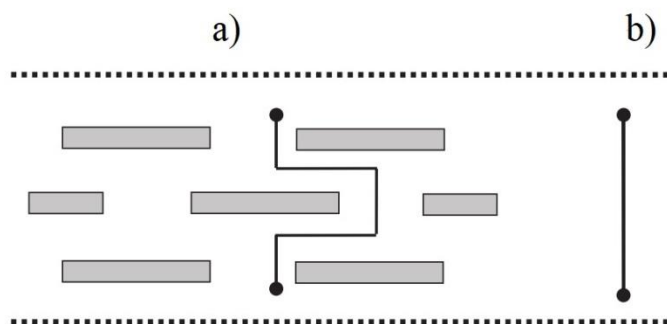


Figura 1.8. Ilustración esquemática de la tortuosidad producida por láminas de arcillas exfoliadas en una matriz polimérica. A) Bionanocompuesto exfoliado y b) polímero sin carga.<sup>65</sup>

Los bionanocompuestos más estudiados se pueden obtener con diferentes matrices poliméricas, tales como el ácido poliláctico, celulosa, almidón, polihidroxibutirato-valerato (PHBV) o polihidroxibutirato (PHB). Por ejemplo con la obtención de bionanocompuesto de ácido poliláctico (PLA)/arcilla<sup>66,67,68,69</sup> mejoró la resistencia a la rotura hasta en un 135% del PLA con un 6% de arcillas, la permeabilidad al oxígeno disminuyó en un 69% cuando se utiliza 10% m/m de montmorillonita organomodificada con una sal de amonio cuaternaria<sup>70</sup> y la temperatura de degradación aumento en 40 °C.<sup>66</sup> Por otra parte se ha observado que con 1% de arcilla los bionanocompuestos de PLA muestran una reducción de la permeabilidad al vapor de agua de un 25%.<sup>74</sup>

Los bionanocompuesto de PHBV/arcilla<sup>71</sup> reducen la degradación térmica, aumentan el grado de cristalinidad, mejoran el módulo de Young y la deformación a la rotura<sup>72</sup> del PHBV con la incorporación de 3% de arcilla.<sup>73</sup> En el caso del almidón, la obtención de bionanocompuestos almidón/arcilla mediante mezclado en estado fundido, muestran un aumento del módulo de Young, de la resistencia a la tracción, y la permeabilidad al vapor de agua se disminuyó.<sup>75</sup>

También se han obtenido bionanocompuestos de mezcla de ATP-PLA los cuales con un 1% de arcilla han aumentado la resistencia a la tracción desde 5,63 a 7,95 MPa.<sup>76</sup> Los bionanocompuesto PHBV con un 1% de arcilla aumento en un 70% la resistencia a la tracción.<sup>74</sup> Finalmente los bionanocompuestos han mejorado las

propiedades de la poli( $\epsilon$ -caprolactona) un polímero biodegradable de origen sintético, donde se obtuvo una alta rigidez, una buena ductilidad y una mejor estabilidad térmica con un bajo contenido de arcilla (<5% en peso).<sup>77,78</sup> Por lo tanto, la obtención de bionanocompuestos abre nuevas posibilidades para igualar las propiedades de los biopolímeros con las de los polímeros sintéticos.

La mayoría de las investigaciones de bionanocompuesto de polihidroxicanoatos es con respecto al copolímero (PHBV) ya que posee una ventana de procesamiento mayor que el PHB. Con respecto a los bionanocompuesto de PHB los resultados en literatura muestran que existe un efecto nucleante por parte de las diferentes arcillas estudiadas Na-Montmorillonita y 30B-Montmorillonita (montmorillonita modificada orgánicamente) ya que ambas aumentaron el módulo elástico del PHB (método mezclado en estado fundido).<sup>79</sup> También se han mejorado las propiedades mecánicas tales como el módulo de almacenamiento el cual aumentó en un 85%.<sup>80</sup>. Se ha determinado que existe un efecto mínimo en el grado de cristalización y la temperatura de fusión cuando se trabaja con arcillas como Na-Montmorillonita y montmorillonita modificada (Cloisite®15A y C93A).<sup>81</sup>

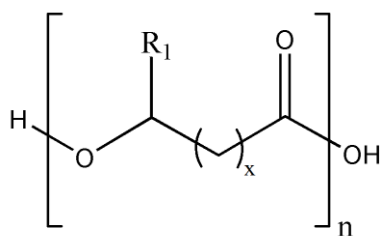
También se ha investigado los bionanocompuestos formados por mezclas de polímeros PHBV/Almidón termoplástico (ATP) en que la arcilla no solo mejora las propiedades de los polímeros sino que también actúa como compatibilizante entre los dos polímeros.<sup>82</sup>

## 1.5 Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) pertenecen a la familia de los poliésteres, son polímeros termoplásticos por lo que pueden ser moldeados al igual que los polímeros sintéticos. Además, son biocompatibles y biodegradables. Su unidad repetitiva es el ácido R-hidroxicanoico (ver figura 1.9) donde dependiendo del tipo de sustituyente y del largo de la cadena se pueden obtener diferentes polímeros. Los PHAs pueden ser sintetizados por una gran variedad de microorganismos (bacterias gram positiva y gram negativa, hongos y cepas recombinadas) porque sirven como reserva de carbono y energía. Los PHAs se acumulan en forma de gránulos intracelularmente donde pueden alcanzar hasta el 90% del peso seco de la célula,<sup>83</sup> formando parte de la membrana citoplasmática y del citoplasma. Los microorganismos que sintetizan este biopolímero usualmente lo hacen bajo condiciones limitantes de nutrientes esenciales como N, P, O, S, o Mg, y en presencia de una fuente de carbono en exceso. Sin embargo, algunas bacterias, tales como *A. vinelandii* UWD y *A. eutrophus*, *A. latus* y



*Azotobacter vinelandii*<sup>84</sup> son capaces de acumular PHAs en condiciones no limitantes.



<b>x=1</b>	<b>R<sub>1</sub>= Hidrógeno</b>	<b>Poli (3-hidroxiopropionato)</b>
	R <sub>1</sub> = metil	Poli(3-hidroxi butirato) [P(3HB)]
	R <sub>1</sub> = etil	Poli (3-hidroxi valerato)
	R <sub>1</sub> = propil	Poli (3-hidroxi hexanoato)
	R <sub>1</sub> = pentil	Poli (3-hidroxi octanoato)
	R <sub>1</sub> = nonil	Poli (3-hidroxi dodecanoato)
<b>x=2</b>	R <sub>1</sub> = Hidrógeno	Poli (4-hidroxi butirato)
	R <sub>1</sub> = metil	Poli(4-hidroxi valerato) [P(4HV)]
<b>x=3</b>	R <sub>1</sub> = Hidrógeno	Poli (5-hidroxi valerato)
	R <sub>1</sub> = metil	Poli (5-hidroxi hexanoato) [P(5HHx)]
<b>x=4</b>	R <sub>1</sub> =hexil	Poli (6-hidroxi dodecanoato)

Figura 1.9. Estructura de los polihidroxi alcanoatos sintetizados por bacterias.<sup>85</sup>

Hasta el año 2011 se reportaron más de 150 tipos de PHAs<sup>86</sup> producidos biológicamente por diferentes tipos de microorganismo (infraestructura metabólica), diferentes sustratos y diferentes condiciones de cultivos, permiten obtener distintos tipos de PHA. Una clasificación general de los PHAs es de acuerdo al número de carbonos en el grupo R se clasifican en 3 grupos: **longitud de cadena corta** (*short-chain length, SCL*) los cuales tienen de 3-5 átomos de carbono, presentan propiedades similares a los plásticos convencionales (termoplástico); **longitud de cadena media** (*medium-chain length MCL*) los cuales tienen entre 6-14 átomos de carbono y son considerados como elastómeros<sup>87</sup> y finalmente **longitud de cadena larga** (*long-chain-length LCL*) los cuales tienen de 15 átomos de carbono en adelante. Los dos tipos más comunes de PHAs son de cadena corta: el homopolímero poli 3-hidroxi butirato (PHB) y el copolímero poli(hidroxi butirato-co-valerato) (PHBV) (ver figura 1.10).

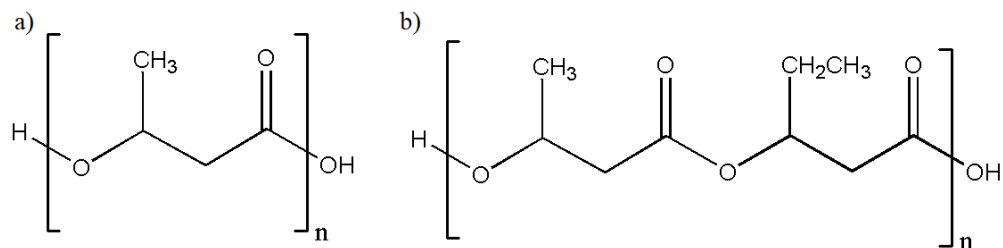


Figura 1.10. a) Unidad repetitiva del Poli(3-hidroxi butirato) y b) Unidad repetitiva del copolímero (polihidroxi butirato-*co*-valerato). Fuente: elaboración propia.

El PHB es un polímero semicristalino con una coloración amarillenta, presenta una alta temperatura de fusión, un alto grado de cristalinidad (60-80%) y una alta temperatura de transición vítrea, y esta última influye en que sea rígido y quebradizo. Posee propiedades similares a las del polipropileno isotáctico, tal como lo muestra la tabla 1.2. Entre ellas destaca el módulo elástico que indica qué tan rígido o flexible es un polímero, por lo que es una propiedad interesante de analizar cuando se busca obtener materiales para aplicaciones en la vida cotidiana. El PHB además de ser biodegradable es que sus propiedades barreras (permeabilidad oxígeno o al dióxido de carbono) son mejores que las de polietileno de baja densidad<sup>88</sup> lo que permitiría su aplicación como material para envases. Una desventaja que presenta el PHB es su temperatura de descomposición (210 °C) la cual se encuentra muy cerca a la temperatura de fusión (~170 °C) produciendo una ventana de procesamiento estrecha. Esto ha sido mejorado mediante la incorporación de agentes plastificantes (ésteres de ácido cítrico). Finalmente también se debe considerar que desde el punto de vista industrial su obtención es poco viable, por el tipo de sustrato utilizado (glucosa, fructuosa o sacarosa) para la fermentación microbiana y que son pocas las bacterias que obtienen buenos rendimientos<sup>89</sup> y lo anterior se reflejaba en su alto costo. Para contrarrestar el problema del sustrato se están utilizando desechos agroindustriales, con el fin de abaratar costos.<sup>3</sup>

Tabla 1.2. Comparación de propiedades térmicas y mecánicas de un PHA con un polímero sintético.<sup>90</sup>

Propiedades	PHB	Polipropileno (PP)
Temperatura de fusión (°C)	180	176
Temperatura de transición vítrea (°C)	4	-10
Módulo elástico (GPa)	3,5	1,7
Alargamiento a la rotura (%)	5	400
Resistencia a la tracción (MPa)	40	34,5
Grado de Cristalinidad (%)	60-80	70

Para modificar algunas propiedades del PHB se han incorporado aditivos como agentes nucleantes o plastificantes, realizando copolimerizaciones y obtenido mezcla de polímeros,<sup>91</sup> idealmente biodegradables. Las mezclas de biopolímeros han sido ampliamente examinadas, determinándose mejoras de las propiedades mecánicas y térmicas,<sup>92</sup> además es una opción para mejorar la procesabilidad y reducir la fragilidad del PHB.<sup>93</sup>

## 1.6 Almidón

El almidón es un polisacárido, de baja densidad y biodegradable. Corresponde a un hidrato de carbono, almacenado en las plantas tales como tubérculos, cereales, y legumbres, y está organizado en partículas discretas conocidas como gránulos (debido a los enlaces de hidrógeno inherentes entre las moléculas), cuya morfología, composición química y estructura molecular son características de la fuente de donde provengan. El almidón está compuesto por dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal compuesto por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídico  $\alpha$ -1,4. La amilopectina un polímero ramificado compuesto por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídico  $\alpha$ -1,4 y ramificaciones  $\alpha$ (1-6) ( ver figura 1.11) que constituyen entre el 4 y 5% total de los enlaces en el almidón.<sup>94</sup>

La amilosa es el componente que influye en el grado de cristalinidad del almidón, por lo tanto dependiendo de la fuente de donde se extraiga dependerá qué tan cristalino o amorfo será el almidón, por ejemplo el maíz puede tener entre 26 y 28% de amilosa a diferencia de la papa que su rango se encuentra entre 20 y 25% de amilosa, para el primero el porcentaje de cristalinidad es de 39% y para el almidón de papa es de un 25% de cristalinidad.<sup>95</sup> Éste biopolímero es uno de los más utilizados por ser un material renovable y ampliamente disponible. Es completamente biodegradable en el suelo y el agua. Sin embargo, sus aplicaciones han sido limitadas debido a sus bajas propiedades de barrera y mecánicas, procesabilidad y estabilidad térmica.

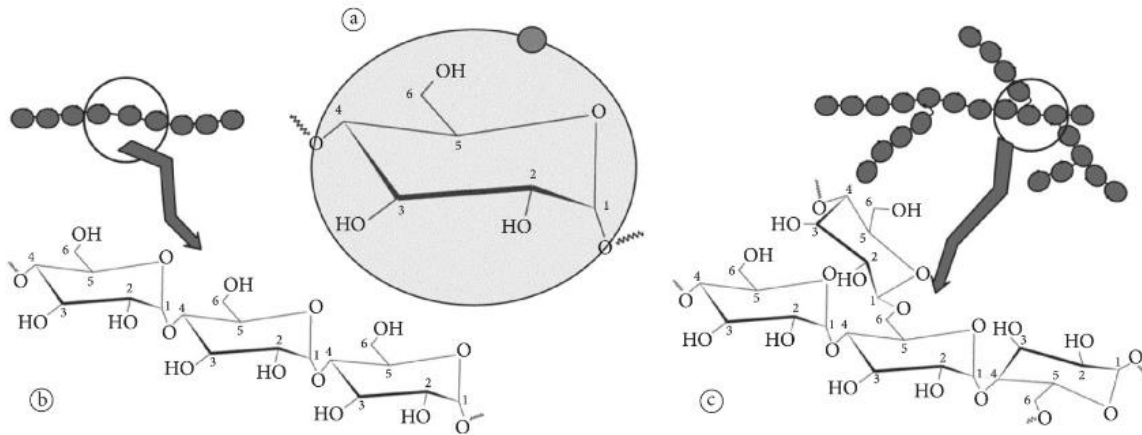


Figura 1.11. Diseño de una estructura básica de almidón, a) unidades de glucosa, b) amilosa y c) amilopectina.<sup>96</sup>

El almidón no es un termoplástico real ya que la temperatura de reblandecimiento es superior a su temperatura de degradación debido a la presencia enlaces de hidrógeno intramoleculares,<sup>97</sup> pero la presencia de un plastificante tal como agua, glicerol, sorbitol, urea o ácido cítrico, produce una disminución de las temperaturas de transición vítrea y de reblandecimiento. Además, se deben aplicar altas temperaturas, y cizallamiento (deformación producida por una fuerza), así el almidón se funde y fluye, lo que permite su uso en inyección, extrusión y equipo de soplado, al igual que los polímeros sintéticos.<sup>98</sup>

El almidón termoplástico (ATP) tiene aplicaciones limitadas debido a que persiste su sensibilidad a la humedad y sus propiedades mecánicas inferiores a las de los polímeros sintéticos. Para mejorar algunos de estos inconvenientes, el ATP se mezcla a menudo con algunos polímeros sintéticos biodegradables tales como poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL),<sup>99</sup> poli (ácido láctico) (PLA), alcohol polivinílico (PVOH) o polihidroxialcanoatos que tienen mejores propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua, además de un gran potencial para aplicaciones de embalaje.<sup>100</sup>

Hay investigaciones que obtienen mezcla de almidón termoplástico-PVOH, las cuales han mejorado la resistencia a la tracción de 1,8 MPa (ATP) a 4 MPa en la mezcla con PVOH. También se ha mejorado el porcentaje de elongación aumentando de 113 a 150%, trabajando solo con un 10% de PVOH.<sup>101</sup> Para mezclas PHBV-almidón se ha observado que mantienen sus buenas propiedades biodegradables y se mejoran las propiedades mecánicas, pero se necesita de agente compatibilizante para mejorar las interacciones almidón-PHBV.<sup>99,102,103</sup> Las mezclas PHB-almidón se han obtenido en su mayoría mediante el método del *films-casting* (se disuelven los polímeros en un

solvente y son colocados en un molde para darle la forma de película), se ha demostrado que las mezclas PHB-almidón aumentan la estabilidad térmica del PHB obteniendo un aumento entre el 5% y 16%.<sup>104,105</sup> La temperatura de fusión disminuye hasta 141 °C con un 20% de almidón.<sup>106</sup> La resistencia a la tracción disminuye cuando se va aumentando el contenido de almidón,<sup>102,106</sup> pero también se ha mejorado hasta en un 70% con respecto al PHB.<sup>105</sup> En general la mezcla PHB/ATP<sup>107</sup> depende del compatibilizador, si el almidón es modificado<sup>108</sup> y del contenido de amilosa<sup>109</sup> para mejorar las propiedades mecánicas.

### **1.7 Problemática a resolver**

En lo descrito anteriormente se destacó que uno de los sectores más importantes de la industria del plástico son los envases, la cual tiene la mayor demanda de polímeros sintéticos (PP, PE, PET). Su uso se encuentra enfocado para períodos de tiempos cortos, lo que se traduce en una alta contribución a la acumulación de desechos. Por lo tanto, este sector presenta varios desafíos, disminuir el impacto medio ambiental de los polímeros sintéticos, potenciando el reciclaje o fomentando el uso de polímeros biodegradables, para lo cual se deben mejorar algunas desventajas que estos presentan para hacerlos competitivos frente a los polímeros sintéticos. Otro aspecto es obtener materiales poliméricos biodegradables con mejores propiedades mecánicas, térmicas y de barrera, además que sean capaces de interactuar con el alimento mediante la incorporación de agentes antimicrobianos o antioxidantes, permitiendo el aumento de la vida útil del alimento, extendiendo sus buenas propiedades en el tiempo. Esto potenciaría la exportación de los alimentos permitiendo su transporte a mayores distancias sin perder sus propiedades.

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral es desarrollar un nuevo material a base a bionanocompuestos, con el fin de mejorar las desventajas que presentan los polímeros biodegradables. Se ha demostrado que se pueden mejorar las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera de los biopolímeros utilizando bajas concentraciones de arcillas, las que además permiten mejorar la interacción entre los polímeros. Finalmente, para obtener un material para envases activos se utilizarán aceites esenciales, los cuales presentan actividad antimicrobiana y antioxidante, lo que permitiría proteger a los alimentos de diferentes patógenos o procesos de oxidación los cuales llevan a la descomposición del alimento.

## CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

La obtención de bionanocompuesto polihidroxitirato-almidón termoplástico/arcilla mejorará las propiedades mecánicas y térmicas de la mezcla PHB-ATP, las que dependerán de la interacción de ambos polímeros (polihidroxitirato-almidón) con la arcilla.

Con la incorporación de eugenol en el bionanocompuesto se obtendrá un material polimérico biodegradable capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos y evitar procesos de oxidación. El mayor potencial de estas propiedades dependerá de la cantidad de eugenol retenido en el bionanocompuesto.

### 2.2 Objetivo general

Desarrollar bionanocompuestos con actividad antimicrobiana y antioxidante para su posible uso en envases activos para frutas y carnes.

### 2.3 Objetivos específicos

1. Sintetizar bionanocompuestos de mezclas de polihidroxitirato y almidón utilizando como nanorelleno montmorillonita modificada.
2. Incorporar componentes de aceites esenciales como agentes antimicrobianos y antioxidantes (eugenol) a la síntesis de los bionanocompuestos.
3. Determinar las propiedades morfológicas, mecánicas, térmicas de la mezcla de biopolímeros, bionanocompuestos y luego bionanocompuestos con los agentes antioxidantes y antimicrobianos.
4. Realizar ensayos antifúngicos *in vitro* para la mezcla de biopolímeros, bionanocompuestos y bionanocompuestos con los agentes antimicrobianos.
5. Determinar la capacidad antioxidante de la mezcla de biopolímeros, bionanocompuestos y bionanocompuestos con los agentes antioxidantes.
6. Determinar la biodegradabilidad de la mezcla de biopolímeros y de los bionanocompuestos.

## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Reactivos

Pellet de Polihidroxitirano (PHB), con las siguientes características, densidad 1,25 g/cm<sup>3</sup>, velocidad de flujo de fusión 9-13 (g/10 min), Temperatura de fusión 165 °C, M<sub>w</sub>= 426000 fueron adquiridos en Biomer, Krailling, Alemania. El Almidón de maíz (amilopectina 73 % y amilosa 27 %) adquirido en Sigma-Aldrich, EE.UU. Arcilla Montmorillonita modificada con un 25-30% con metildihidroxietyl amonio (Nanomer I34TCN) fue adquirida en Sigma-Aldrich, Nanocor, EE.UU (ver figura 3.1).

2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), fue adquirido de Sigma Aldrich, Alemania. Eugenol (98%), densidad 1,0660 g/cm<sup>3</sup>, fue adquirido de Sigma Aldrich, China. Alcohol Etílico (99,9%) fue adquirido en Winkler, Chile. Metanol, densidad 0,792 Kg/L fue adquirido en Merk, EE. UU. Glicerol 99,95%, densidad 1,259 g/L fue adquirido en Winkler, Chile. Agar de dextrosa de patata adquirido en Becton, Dickson & Co, Francia.

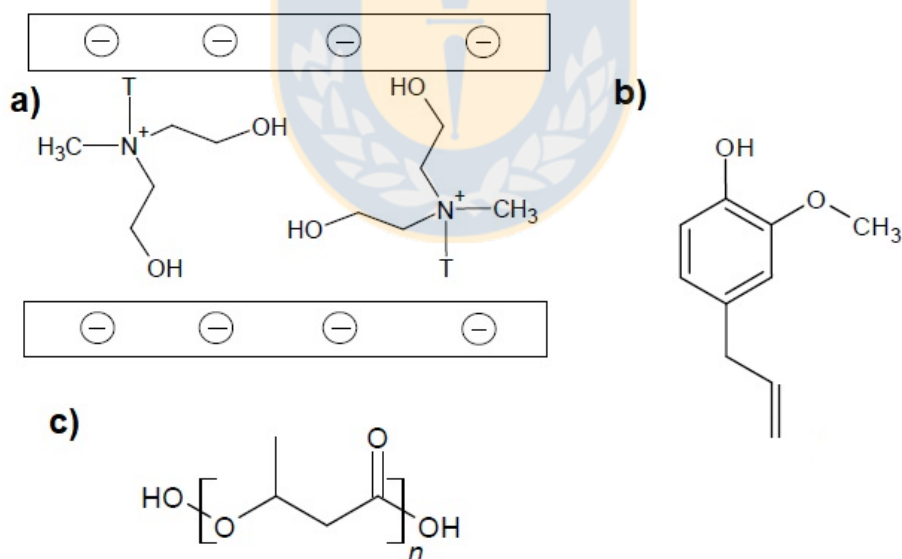


Figura 3.1. a) Montmorillonita modificada con un 25-30% con metildihidroxietyl amonio, b) Eugenol y c) Polihidroxitirano (PHB). Fuente: elaboración propia.

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Obtención de bionanocompuesto con actividad antioxidante y antifúngica

#### 3.2.1.1 Obtención de almidón termoplástico (ATP)

La obtención de almidón termoplástico se realizó utilizando glicerina y agua como plastificante, las concentraciones de ambas se definen en la tabla 3.1.

El ATP<sub>1</sub> se obtuvo utilizando un mezclador interno a 60 rpm, una temperatura de 100 °C y un tiempo de mezclado de 10 min. Luego el material obtenido se fragmentó y fue dejado en una estufa a 40 °C por 72 horas, para finalmente ser extruido en una extrusora de doble husillo con 4 zonas de calentamiento (ver figura 3.2). Las zonas de calentamiento fueron definidas en 100-137-150-150 °C, definidas por un estudio previo.

La obtención del ATP<sub>2</sub> se realizó en un solo paso, mediante mezclado en la miniextrusora, cambiando las temperaturas de calentamiento a 90-100-110-110 °C, (para eliminar completamente el agua que participa en la plastificación). De esta forma se obtuvo los pellets con menor temperatura y con una etapa menos. Es importante considerar en esta metodología que previamente se debe dejar la mezcla secando antes de ser extruida en una estufa durante 48 horas en un horno a 40 °C para evitar que se produzcan burbujas cuando el material polimérico sale de la extrusora.



Figura 3.2. Etapas de procesamiento para obtención de ATP (mezcladora-extrusora-muestra de pellet ATP). Fuente: elaboración propia.



Tabla 3.1. Formulación estudiada para la obtención de ATP.

Muestra	Almidón (%m/m)	Glicerina (%m/m)	Agua (%m/m)
ATP <sub>1</sub>	50	35	15
ATP <sub>2</sub>	60	25	15

### 3.2.1.2 Obtención de mezclas PHB-ATP

Las mezclas polihidroxi-butilato (PHB)- almidón termoplástico (ATP) fueron obtenidas por mezclado en estado fundido en una miniextrusora de doble husillo marca Gulnar Machinery, caracterizada por tener un diámetro de 16 mm y una relación longitud/diámetro del husillo (L/D) de 40:1, que engranan en giro corrotatorio, posee 4 zonas de calentamiento, las que fueron definidas en esta investigación como zona 1 (T<sub>0</sub>), zona 2 (T<sub>1</sub>), zona 3 (T<sub>2</sub>) y zona 4 (T<sub>3</sub>). Para esta primera etapa se realizó un diseño de experimento fijando la zona 1 con un T<sub>0</sub>=100 °C y la zona 4 con una T<sub>3</sub>=175 °C (ver figura 3.3). Se realizó un estudio del efecto de la temperatura en la zona 2 (T<sub>1</sub>) y la zona 3 (T<sub>2</sub>). Las temperaturas estudiadas fueron 130-150 para T<sub>1</sub> y 165-175 para T<sub>2</sub>. Además, se analizó el efecto de la velocidad de mezclado (60 y 100 rpm) y la concentración de ATP (25-35 %m/m de una masa total de 50g).

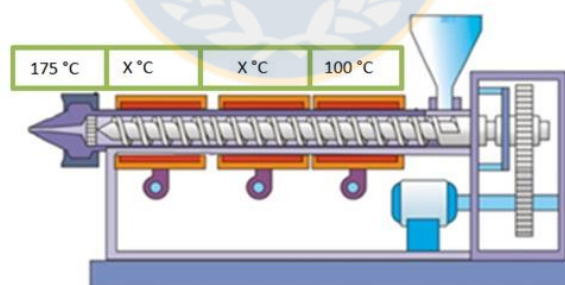


Figura 3.3. Zonas de temperatura en la extrusora. Fuente: elaboración propia.

### 3.2.1.3 Obtención de bionanocompuesto PHB-ATP/Arcilla

Los bionanocompuestos fueron obtenidos mediante mezclado en estado fundido en un mezclador interno marca Haake Rheomix 600p que se encuentra en laboratorio de la Dra. Raquel S. Mauler en la Universidade de Rio Grande du Sol (ver figura 3.4). La arcilla utilizada fue una montmorillonita organomodificada (OMMT) la que se trabajó en concentraciones de 1, 3 y 5% m/m (masa total 50 g). La composición de la mezcla

PHB/ATP se dejó fija en 65% m/m de PHB y 35% m/m de ATP<sub>1</sub>, donde se obtuvo el menor módulo elástico (para acercar las propiedades mecánicas del bionanocompuesto al del polietileno) según lo determinado en la primera parte. También con el estudio anterior quedó establecida la temperatura de trabajo, en 175 °C ya que el mezclador interno posee solo una temperatura.



Figura 3.4. Mezclador interno, Haake Rheomix. Fuente: elaboración propia.

#### **3.2.1.4 Obtención de bionanocompuestos con Eugenol PHB-ATP/OMMT/Eug**

Los bionanocompuestos con eugenol fueron obtenidos en una extrusora de doble husillo con 4 zonas de calentamiento. Las zonas de calentamiento fueron definidas en 100-140-160-155 (°C). Se realizó un diseño de experimento con el software MODDE 7, específicamente un *screening Full Fact* de dos niveles, para estudiar la importancia de las variables con respecto a la cantidad eugenol presente en el bionanocompuesto (velocidad de mezclado, concentración de arcilla y eugenol) por lo que se llevó a cabo 8 experimentos más sus puntos centrales. La temperatura de la extrusora es un parámetro que se analizó con un diseño experimental anterior y se concluyó que debía quedar fija en 140 °C y que la concentración de eugenol no debía ser menor a al 2 %m/m. La velocidad se estudió en un rango de 60 a 80 rpm, la concentración de arcilla de 1 a 3 %m/m y la concentración de eugenol entre 2 y 3 %m/m.

#### **3.2.2 Caracterización**

##### **3.2.2.1 Análisis estructural bionanocompuestos**

El análisis estructural del PHB, el ATP, la mezcla y el bionanocompuesto se realizó mediante FT-IR acoplado a ATR para identificar los grupos funcionales característico, mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) en el rango espectral de 400 a 10 000  $\text{cm}^{-1}$ . El equipo se trabajó con modo de reflectancia total atenuada (ATR), ya que así la muestra no necesita un espesor definido ni tampoco un tratamiento previo.

### 3.2.2.2 Análisis morfológico de los bionanocompuestos

Se realizó el análisis morfológico mediante Difracción de rayos de X y Microscopía Electrónica de Transmisión de los bionanocompuesto para definir qué tipo de morfología se encontraba en el material polimérico. Además, se realizó Microscopía Electrónica de Barrido para analizar la superficie de los diferentes materiales.

a) **Difracción de rayos de X (DRX):** Mediante la difracción de rayos X de arcillas, se observa la posición del pico asociado a la reflexión basal (plano 001), y mediante la aplicación de la ecuación de Bragg, es posible calcular la distancia interlamina de la arcilla. En los bionanocompuestos polímero/arcilla se puede calcular el espaciado basal de la arcilla después de haber sido mezclada con el polímero. En este caso, la observación del patrón de difracción puede aportar información de si se presenta una estructura tactoide (no hay variación de pico de la arcilla), intercalada (hay un desplazamiento de pico hacia ángulos más bajos), exfoliada (el pico desaparece) lo cual debe ser corroborada por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Se utilizó un difractómetro Bruker AXS D4 Endeavour, con una radiación de Cu (40 kV, 20mA) a una velocidad de barrido de  $1^\circ \text{min}^{-1}$  para un intervalo de barrido con ángulo  $2\theta$  entre  $2^\circ$  y  $40^\circ$ . Las muestras analizadas tenían la forma de películas de 3 cm por 3 cm.

**Microscopía Electrónica de Transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM):** La principal aplicación de TEM es analizar cómo se encuentran las capas de arcillas en el bionanocompuesto o sea que morfologías están presentes (tactoide, intercalada o exfoliada) y corroborar o complementar lo determinado en DRX.

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL/JEM 1200 EX II operado a 120 kV. Las muestras se dejan en resina por 48 horas para poder lograr un corte nanométrico y poder ser analizadas.

**Microscopía Electrónica de Barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*):** Mediante SEM se analiza la superficie del PHB, ATP, la mezcla PHB-ATP y de los bionanocompuestos para determinar si se altera con la presencia de los diferentes componentes.

Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-6380.

**Microscopía de Fuerza Atómica (*Atomic Force Microscopy, AFM*):** AFM se utilizó para determinar la topografía y la rugosidad de los materiales poliméricos. Este análisis se llevó a cabo en un equipo Park XE150 en modo no contacto.

### 3.2.2.3 Propiedades mecánicas de los bionanocompuestos

Las propiedades mecánicas de los materiales poliméricos fueron analizadas mediante un ensayo de tracción, principalmente para analizar el cambio del módulo de elástico.

**Ensayo de Tracción:** Se obtienen propiedades mecánicas como módulo elástico (E), Resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura, entre otros. Este ensayo se realizó según la norma ASTM D-638.

Este ensayo se llevó a cabo en un equipo de ensayo universal modelo Z05 de la marca Zwick Roell.

También se determinó el módulo elástico en equipo de Análisis Mecánico Dinámico (DMA) en modo tracción. Las condiciones de ensayo que se fijaron en 0,50 N/min a 18 N, temperatura de 25 °C, la separación de mordazas de 11,50 mm aproximadamente y la obtención del módulo elástico se determinó entre el 0 y 0,15% de deformación. En este análisis se trabajó con probetas de 2,5 cm de longitud y 0,5 cm de ancho, todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra.

**Nanoindentación:** La nanoindentación permite obtener la dureza y el módulo elástico de los materiales poliméricos. El módulo elástico (E) fue obtenido de la pendiente inicial de la curva descarga versus desplazamiento según las ecuaciones 1 y 2.

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \quad (1) \quad E_r = \frac{\sqrt{\pi} S_{max}}{2\sqrt{A}} \quad (2)$$

Donde  $E_r$  es el módulo reducido,  $E$  el módulo elástico y  $\nu$  son las proporciones de Poisson del material, los valores correspondientes para la punta de diamante son de  $E_i$  (1140 GPa),  $\nu_i$  (0,07) y el PHB tiene un  $\nu$  (0,35),<sup>110</sup> En la Ec. 2  $S_{max}$  es la pendiente de la curva de descarga (figura 3.5)  $dP/dh$  en el inicio de la descarga y  $A$  es el área de contacto proyectada entre el material y el indentador a carga máxima calculada a partir de la función de área del penetrador  $A=f(h_c)$  que relaciona el área con la profundidad de contacto  $h_c$ . La función de área se calibra a partir de indentaciones en una muestra de referencia de sílice fundida de módulo elástico conocido.

Por otra parte, se determinó la dureza ( $D$ ) que corresponde al punto máximo de la curva ( $P_{max}$ ) carga-desplazamiento (ecuación 3).

$$D = \frac{P_{max}}{A} \quad (3)$$

Las nanoindentaciones se realizaron mediante un nanoindentador Hysitron TI900, con una punta de diamante tipo cube corner, se determinó una profundidad máxima de aproximadamente de 500 nm y se utilizó una carga nominal de 100  $\mu$ N.

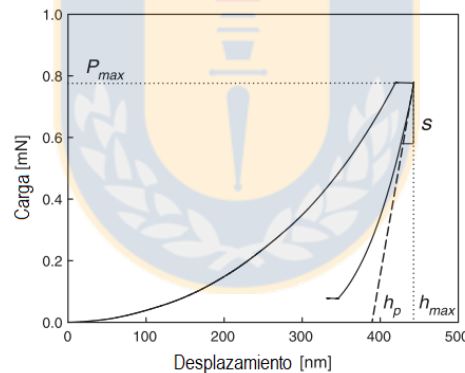


Figura 3.5. Curva típica de Carga-Desplazamiento en un ciclo de nanoindentación.<sup>111</sup>

### 3.2.2.4 Propiedades reológicas

Las propiedades viscoelásticas de los materiales poliméricos se determinaron mediante análisis dinámico mecánico térmico (*Dynamic Mechanical Thermal Analysis*, DMTA).

Los ensayos se realizaron en un equipo de Análisis Mecano-Dinámico (Q800, TA Instruments) en modo tensión. Se definió un rango de temperatura de -140 a 110 °C, con una velocidad de calentamiento de 2 °C  $\text{min}^{-1}$  y una frecuencia de 1, 3, 10 y 20

Hz. El módulo de almacenamiento, el módulo de pérdida y el factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) se calcularon en función de la temperatura.

### 3.2.2.5 Propiedades térmicas de los bionanocompuestos

#### **Calorimetría Diferencial de Barrido (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*).**

Mediante DSC se determinó la temperatura de fusión ( $T_f$ ), entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ), temperatura de cristalización ( $T_c$ ), entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) y se calculó el grado de cristalinidad a partir de entalpía de fusión ( $X_c$ ).

El análisis térmico DSC se realizó en un Equipo DSC 204 F1 Phoenix. La velocidad de calentamiento y enfriamiento para los escaneos fue de  $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Las muestras se calentaron de  $25$  a  $200\text{ }^\circ\text{C}$  y posteriormente se enfriaron hasta  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Se aplicó una segunda etapa de calentamiento hasta  $200\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Análisis Termogravimétrico (TGA):** Los parámetros obtenidos por TGA son temperatura descomposición ( $T_d$ ), y la temperatura cuando se ha perdido un 5%, 10% y un 50% en masa ( $T_{5\%}$ ,  $T_{10\%}$ ,  $T_{50\%}$ ).

El análisis TGA se realizó en un Equipo TGA 209 F1 Iris. La velocidad de calentamiento fue de  $20\text{ }^\circ\text{C/min}$  y el rango de temperatura se estableció de  $30$  a  $550\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2.6 Actividad Antifúngica *in vitro* de los bionanocompuestos

Para los ensayos antifúngicos, se cultivó el microorganismo *Botrytis cinerea* en placas de Petri PDA (agar de patata dextrosa) durante tres semanas a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . La suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* se diluyó con agua destilada hasta obtener  $1 \times 10^5$  conidias / mL. Las diferentes películas fueron cortadas con un diámetro de  $1,3\text{ mm}$  y se colocó cada una en una placa con un agar de PDA, sembrada con  $0,1\text{ ml}$  de la suspensión de esporas de hongos. Las placas fúngicas se incubaron a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 días, y luego se observó el área de inhibición. Todas las placas se fotografiaron junto a una regla el día 7, luego se calculó el área de inhibición mediante el software Adobe Photoshop CS5®, el cual se calibra con la regla que aparece en la fotografía, el software hace la equivalencia de píxeles a cm. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado.

### 3.2.2.7 Actividad Antioxidante de los bionanocompuestos

Se evaluó la actividad antioxidantes de las muestras de PHB-ATP, PHB-ATP/Arcilla (3%), PHB-ATP/Arcilla (3%)/Eug (2,5%) y PHB-ATP/Arcilla/Eug(3%). Se masaron aproximadamente 60 mg de muestra, las cuales se sumergen en 10 mL de una solución 0,1 mM de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) en metanol. Las muestras se mantuvieron herméticamente cerradas en tubos ámbar y protegidas de la luz durante 30 min, sin agitación. Se realizó un ensayo de control en las mismas condiciones usando una película no impregnada (PHB) y un control positivo (ácido ascórbico 3 mM) en las mismas condiciones de ensayo. Las mediciones de absorbancia de la fase líquida de las muestras se realizaron en un espectrofotómetro Cary 100 UV/VIS a una longitud de onda de 515 nm. El porcentaje de inhibición de DPPH (% I) de cada muestra se calculó de acuerdo con la siguiente formula<sup>27</sup>

$$\% I = \left( \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100$$

Donde  $A_{control}$  y  $A_{muestra}$  son los valores de absorbancia a 515 nm del control y de las diferentes muestras, todas las muestras se hicieron por triplicado.

### 3.2.2.8 Cuantificación de Eugenol en los bionanocompuestos

Se determinó el porcentaje real de eugenol en los bionanocompuestos ya que durante el proceso de mezclado en fundido comúnmente existe una pérdida de eugenol. Se cortaron películas de bionanocompuestos de 3 cm de alto x 1 cm de ancho, luego se sumergen en 10 ml de etanol, se dejaron reposar por 24 horas para después agitar las soluciones durante 4 horas a 100 rpm mediante un agitador de baño de agua. Las determinaciones de eugenol se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Cary 100 UV / VIS.

Para la correcta cuantificación de eugenol en el espectrofotómetro se determinó la longitud de onda del eugenol en etanol para lo cual se realizó un barrido entre 200 y 400 nm. Se trabajó con etanol como blanco y con una disolución de eugenol diluida (104,5 mg/L) y se determinó que el compuesto posee una longitud de onda de 282 nm que corresponde al valor máximo obtenido del barrido como lo muestra la figura 3.6.

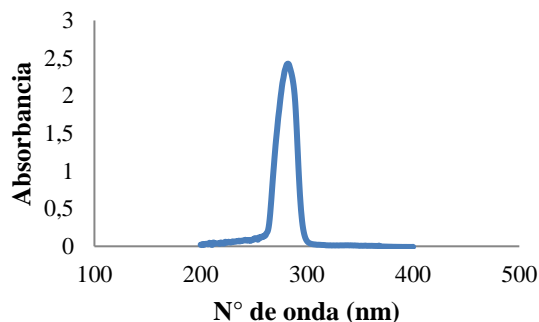


Figura 3.6. Gráfica de absorbanza versus longitud de onda de una muestra de eugenol diluida en etanol. Fuente: elaboración propia.

Definida la longitud de onda a trabajar se obtuvo la curva patrón la cual comenzó en 10,4 mg/L hasta 104,5 mg/L la que fue preparada como se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Datos sobre la composición en volumen de las muestras utilizadas para realizar la recta patrón cuando se utiliza etanol como solvente.

Matraz	Volumen de muestra	Origen de muestra	Volumen de etanol (mL)	Volumen total (mL)	Concentración mg/L	Absorbancia
Solución inicial (Si)	10 µL	Eugenol	10	10	1045	
5	2 mL	Si	18	20	104,5	2,191
4	4 mL	5	6	10	41,8	0,936
3	3 mL	5	7	10	31,8	0,686
2	2 mL	5	8	10	20,9	0,462
1	1 mL	5	9	10	10,4	0,242

La curva patrón presentó una recta de regresión con un coeficiente de correlación de 0,9997. Todas las muestras se midieron por triplicado.

### 3.2.2.9 Ensayo de biodegradación de los bionanocompuestos

El ensayo de biodegradación se realizó bajo condiciones de compostaje siguiendo la norma ISO 20200 que considera el grado de desintegración de los materiales plásticos bajo condiciones simuladas de compostaje en una prueba a escala de laboratorio. El compost se preparó mezclando un 40% aserrín, 30% comida de conejo, 10% de almidón de maíz, 5% sacarosa, 4% aceite de semilla de maíz, 1% urea y 10% de



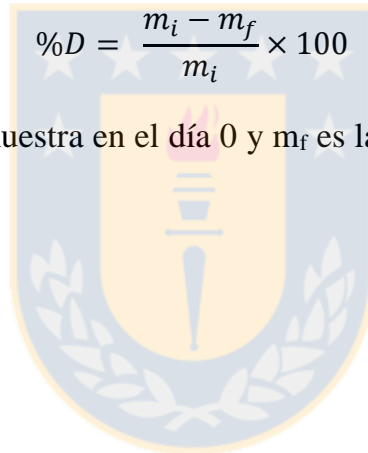
compost maduro (60% de materia orgánica, 40% de materia vegetal, pH 6,5 y un 30% de humedad). El compost se mezcló con agua en una proporción de 45:55 y para mantener la humedad durante el ensayo se agrega agua al contenedor periódicamente.

Las diferentes muestras fueron cortadas en dimensiones de 25 x 25 mm con un espesor menor a 5 mm. Las muestras se enterraron a una profundidad de 5 [cm] de la superficie y con una separación de 3,75 cm. Cada muestra fue contenida en una malla para facilitar su extracción desde el compost.

Los contenedores de dimensiones 38 x 26 x 13 cm se introdujeron en un horno de circulación de aire a 58 °C durante 42 días. Las muestras se recuperaron del contenedor en diferentes días (7, 14, 21, 28, 35 y 42 días), luego de extraídos eran lavado con agua destilada, secados en un horno a 40 °C durante 24 h, para finalmente ser pesados. El porcentaje de degradación (%D) se calculó con la siguiente fórmula:<sup>112</sup>

$$\%D = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Donde  $m_i$  es la masa de la muestra en el día 0 y  $m_f$  es la masa de la muestra en el día de extracción.



## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Obtención de almidón termoplástico (ATP)

El ATP se obtuvo mediante la extrusión de la mezcla almidón-plastificante (glicerina, agua). Para corroborar que el plastificante penetra los gránulos de almidón nativo e interrumpió los enlaces hidrógeno intramoleculares, afectando la estructura cristalina original<sup>113</sup> del almidón nativo se realizaron análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

#### 4.1.1 Análisis Estructural y Morfológico

Por espectroscopia FT-IR se analizaron el almidón nativo (polvo) y el ATP (película), para analizar la diferencia de los picos característicos del almidón.

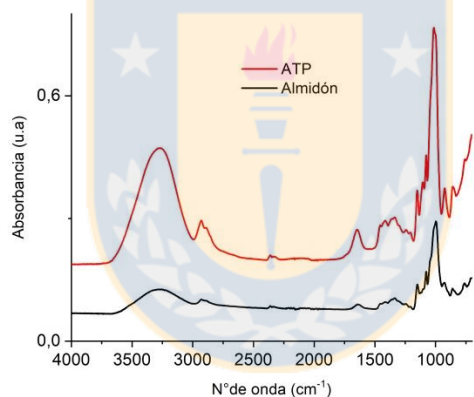


Figura 4.1. Espectros FT-IR para almidón y almidón termoplástico. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.1 muestra que el pico correspondiente a las vibraciones del grupo hidroxilo ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ) del almidón presenta una mayor intensidad en el ATP que en almidón nativo. El cambio en la intensidad del pico se atribuye a la interacción de enlaces hidrógeno intermolecular e intramoleculares en el almidón. El aumento de la intensidad de esta señal en el ATP se atribuiría a un mayor número de interacciones almidón-agua y almidón-glicerina,<sup>114</sup> confirmando la plastificación del almidón, por la penetración de agua y glicerina entre las cadenas, tal como lo muestra la figura 4.2.

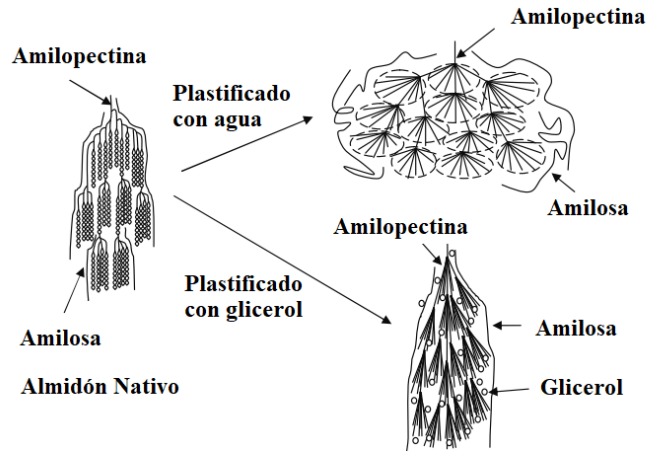


Figura 4.2. Representación esquemática de los cambios estructurales del almidón bajo condiciones de procesamiento.<sup>115</sup>

Se realizó DRX para analizar los cambios ocurridos en los patrones de difracción de la fase cristalina del almidón al ser plástificado. En la figura 4.3 se observan los difractogramas del almidón nativo y de los almidones con plastificante. Se observan dos picos característicos uno a  $13^\circ$  y otro pico a  $19^\circ$  aproximadamente, este último pico es atribuido a la cristalinidad inducida por el procesamiento de amilosa helicoidal, típicamente denominada como  $V_H$ .<sup>116</sup> Con estos resultados se muestra que las zonas cristalinas del almidón nativo se modifican cuando se agrega plastificante (glicerina/agua), lo que indicaría la obtención de ATP.

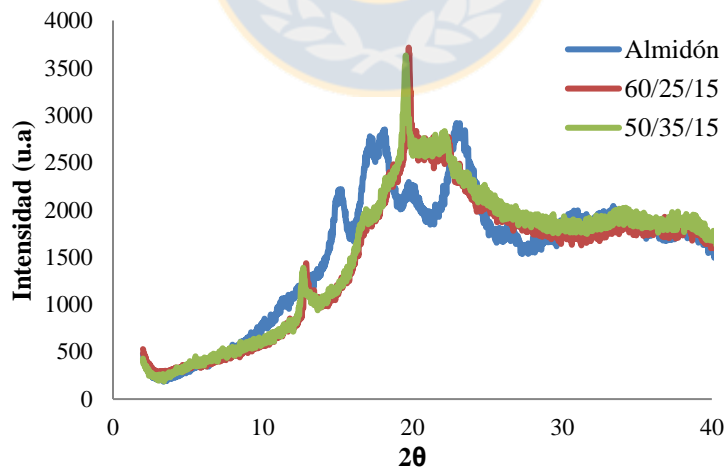


Figura 4.3. Difractogramas para almidón de maíz y almidón/glicerina/agua en concentraciones masa/masa de 60/25/15 y 50/35/15. Fuente: elaboración propia.

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se analizó la superficie del almidón nativo y del almidón termoplástico. Microfotografías representativas se muestran en la figura 4.4. Se observa que el almidón nativo (figura 4.4 a) tiene formas esféricas los cual son denominados gránulos y son su forma característica. Cuando se analiza la figura 4.4 b) que corresponde a la superficie del ATP se presentan algunas zonas lisas y otras zonas con presencia de gránulos de almidón, este resultado es atribuido a que el plastificante (glicerina-agua) penetra la gran mayoría de los gránulos por la cizalla y temperatura aplicada, lo que permite que los gránulos de almidón nativo se fundan o se fragmentan físicamente en trozos más pequeños para formar una fase continua.<sup>117</sup>

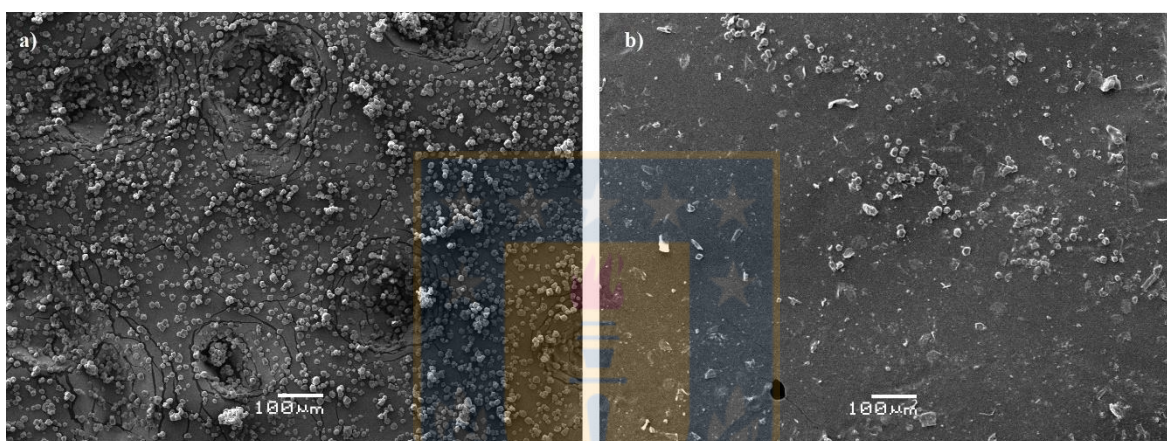


Figura 4.4. Microfotografías SEM para a) almidón nativo y b) Almidón termoplástico. Fuente: elaboración propia.

## 4.2 Obtención de mezcla de polímeros (PHB-ATP)

Luego de realizada la plastificación del almidón nativo, se llevó a cabo la obtención de las mezclas polihidroxibutirato-almidón termoplástico para lo cual se realizó un diseño de experimentos.

### 4.2.1 Diseño de experimento, definición de parámetros

Para la obtención de mezclas PHB-ATP en la miniextrusora hay muchas variables que considerar, aquellas propias de la formulación tales como concentración del PHB o de ATP, parámetros de procesamiento como temperaturas de mezclado de las diferentes zonas (1, 2, 3 y 4) del equipo y velocidad de mezclado, las cuales influyen en una o más respuesta. Para determinar la relación variable-respuesta se realizó un diseño de experimento, el que se basa en cambiar de manera multivariada las diferentes variables buscando realizar el menor número de experimentos posibles.

De las variables de procesamiento se evaluó la temperatura de mezclado en las zonas de mezclado dos (130-150 °C) y zona tres (165-175 °C). También se estudió la relación PHB-ATP, para lo cual se varió la concentración de ATP entre 25 y 35% m/m. La respuesta analizada fue el módulo elástico ya que determina el comportamiento elástico de un material, indicando si es un material polimérico rígido o flexible. Con lo anterior se realizó un diseño experimental de tipo factorial completo (FFD) de cuatro variables a dos niveles ( $2^4$ ) en el cual se analizó como respuesta el módulo elástico. En la tabla 4.1 se presentan los valores definidos por el diseño de experimento con su respectiva respuesta, para lo cual se realizaron 16 experimentos más el punto central por triplicado, en total 19 experimentos con su respuesta respectiva, los cuales se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Número de experimentos realizados según el diseño de experimento FFD con su respectiva respuesta del módulo elástico para las diferentes mezclas obtenidas.

Exp N°	Velocidad (rpm)	Temperatura a zona 2 (°C)	Temperatura a zona 3 (°C)	Concentración ATP (% m/m)	Módulo elástico (MPa)
1	60 (-1)	130(-1)	165(-1)	25(-1)	1240
2	100(+1)	130(-1)	165 (-1)	25(-1)	1140
3	60(-1)	150(+1)	165 (-1)	25(-1)	995
4	100(+1)	150(+1)	165(-1)	25(-1)	976
5	60(-1)	130(-1)	175(+1)	25(-1)	1040
6	100(+1)	130(-1)	175(+1)	25(-1)	1245
7	60(-1)	150(+1)	175(+1)	25(-1)	883
8	100(+1)	150(+1)	175(+1)	25(-1)	611
9	60(-1)	130(-1)	165(-1)	35(+1)	1120
10	100(+1)	130(-1)	165(-1)	35(+1)	795
11	60(-1)	150(+1)	165(-1)	35(+1)	891
12	100(+1)	150(+1)	165(-1)	35(+1)	734
13	60(-1)	130(-1)	175(+1)	35(+1)	680
14	100(+1)	130(-1)	175(+1)	35(+1)	643
15	60(-1)	150(+1)	175(+1)	35(+1)	662
16	100(+1)	150(+1)	175(+1)	35(+1)	414
17	80 (0)	140(0)	170(0)	30(0)	1060
18	80(0)	140(0)	170(0)	30(0)	783
19	80(0)	140(0)	170(0)	30(0)	-

Puntos centrales (0); puntos de esquina (-1/+1)

En la tabla 4.1 se observa que las variables se codificaron con (-1) para el mínimo valor y con (+1) para el mayor valor estudiado. Esto tiene como fin poder trabajar con

diferentes unidades y así el software puede relacionar unas con otras. Las variables codificadas con (0) tienen como fin detectar relaciones no lineales, calcular la varianza (medida de dispersión) del modelo y determinar los intervalos de confianza (números entre los cuales se estima que estará cierto valor).

Al evaluar el diseño de experimento en el software MODDE7 se obtienen los parámetros definidos en la tabla 4.2. El  $R^2$  es la variación de la respuesta explicada por el modelo. (ecuación que describe el comportamiento de un sistema). Sus valores van desde 0 a 1, en que 1 corresponde a que el modelo se ajusta de manera perfecta a los resultados experimentales y 0 a que el modelo no se ajusta a los valores experimentales.  $Q^2$  dice qué tan bien el modelo predice nuevos datos y sus valores van desde  $-\infty$  a 1 hay una buena predicción del modelo cuando existe una diferencia entre 0,2 y 0,3 con  $R^2$ . Con respecto a la validez del modelo este debe poseer un valor mayor a 0,25 lo que indica que no hay falta de ajuste del modelo y la reproducibilidad es una medida del control de error experimental que idealmente deber ser lo más cercano a 1.

Tabla 4.2. Parámetros obtenidos para evaluar el modelo obtenido por regresión lineal multiple.

Parámetros del modelo	Valor
$R^2$	0,86
$Q^2$	0,70
Validez del modelo	0,73
Reproducibilidad	0,96

Con los valores que se observan en la tabla 4.2 se puede concluir que el modelo estadístico se ajusta muy bien a la respuesta experimental ya que el  $R^2$  de 0,86, lo que indica un excelente ajuste y un buen nivel de predicción ( $Q^2 = 0,70$ ).

El modelo estadístico se evaluó usando el test ANOVA y el test falta de ajuste (comparación del error del modelo con el error de réplicas). Se determinó que el modelo de regresión tiene un  $p < 0,000$  lo que significa que es un modelo satisfactorio y confiable, En cuanto a la falta de ajuste presenta un  $p > 0,05$  ( $p = 0,343$ ), valor que indica que el modelo no tiene falta de ajuste (describe adecuadamente la relación funcional entre los factores experimentales y la respuesta).

Validado el modelo estadístico se pueden analizar los coeficientes de la ecuación polinomial que permite determinar cuál es relación variable-respuesta, esto se lleva acabo con una regresión lineal múltiple (MLR), estos valores se encuentran representados en la figura 4.5.

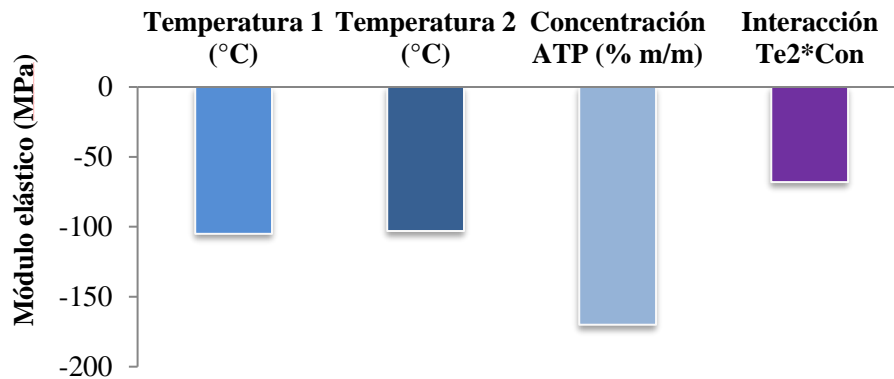


Figura 4.5. Coeficientes del polinomio obtenido para el Módulo elástico. Fuente: elaboración propia.

En la figura 4.5 se observa que de las 4 variables estudiadas la variable velocidad no aparece, ya que fue descartada al ser no significativa ( $p > 0,05$ ) sobre el módulo elástico. La variable con el mayor impacto sobre el módulo elástico es la concentración de almidón termoplástico (ATP). Que su coeficiente sea negativo significa que a menor concentración de ATP mayor será el módulo elástico. Esta conclusión era esperable ya que el ATP es un material flexible y el PHB es un polímero muy rígido<sup>104</sup> (por lo que presenta altos valores de módulo elástico). Las otras variables que corresponden a las zonas de calentamiento de la extrusora también tienen influencia sobre la respuesta estudiada. Para ambas zonas, a menor temperatura de procesamiento mayor es el módulo elástico. Esto podría ocurrir porque a menores temperatura probablemente las cadenas de PHB y ATP logran un mayor ordenamiento por lo que se limita el movimiento de ambas cadenas y de esta forma resultaría un material más rígido.

Los efectos determinados por el modelo estadístico para las variables y respuestas estudiadas se presentan en la siguiente figura 4.6.

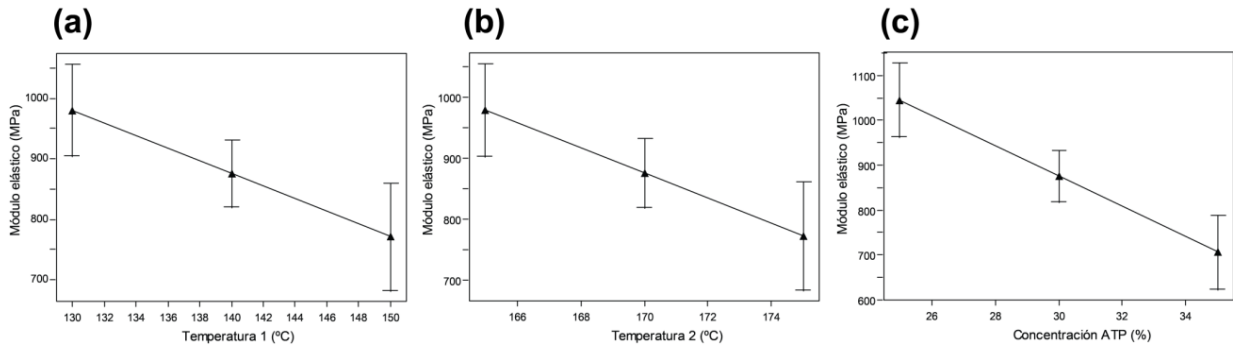


Figura 4.6. Efectos de las variables sobre el módulo elástico. Módulo elástico versus a) Temperatura 1 (°C), b) Temperatura 2 (°C), c) Concentración ATP (% m/m). Fuente: elaboración propia.

Conocido el efecto de las tres variables, se puede analizar el comportamiento del sistema estudiado mediante metodología de superficie de respuesta (RSM). La RSM es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que permiten describir el comportamiento del sistema estudiado en el rango analizado. De esta forma entrega mapas de superficies de las respuestas que predicen los valores del módulo elástico (cuadros blancos) tal como la muestra la figura 4.7.

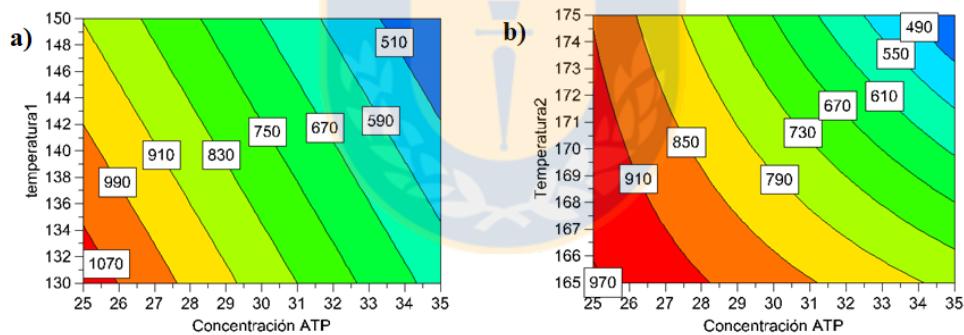


Figura 4.7. Gráficas de contorno obtenidas por MLR a) Concentración ATP (% m/m) versus Temperatura de la zona 2 (°C), con la Temperatura de la zona 1 fija a 150 °C, b) Concentración ATP (% m/m) versus Temperatura de la zona 1 (°C), con la Temperatura de la zona 2 fija a 175 °C. Fuente: elaboración propia.

Las gráficas de contorno muestran cual es la tendencia de la respuesta (módulo elástico) según las diferentes variables analizadas, las zonas rojas y naranjas representan los valores más altos de módulo elástico, lo que indica que el material polimérico obtenido presenta una mayor rigidez con respecto a los valores que se obtienen en los colores verdes (670-830 MPa) y azul correspondiendo a materiales poliméricos menos rígidos (menor módulo elástico) con respecto al PHB. La razón



por la que uno de los gráficos de contorno presente líneas curvas es debido a que existe una leve interacción entre las variables, mientras más torcida mayor interacción.

Como los gráficos de contorno permiten tener una visión global de los resultados se puede concluir que para obtener una mezcla PHB-ATP rígida como el polipropileno isostático (1860 MPa) se debe utilizar una baja concentración (25% m/m) de ATP, pero si requiere una mezcla PHB-ATP más flexible como el polietileno de baja densidad (409 MPa), se debe trabajar con concentraciones cercanas a 35% m/m de ATP.

#### 4.2.2 Análisis estructural y morfológico

El análisis estructural y morfológico se llevó a cabo por espectrofotometría FT-IR, microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos X (DRX)

Los espectros FT-IR fueron analizados para seguir la diferencia de los picos característicos de los materiales de partida (PHB y del ATP) cuando se obtienen las diferentes mezclas PHB-ATP, a fin de conocer si existe interacción entre el PHB y ATP.

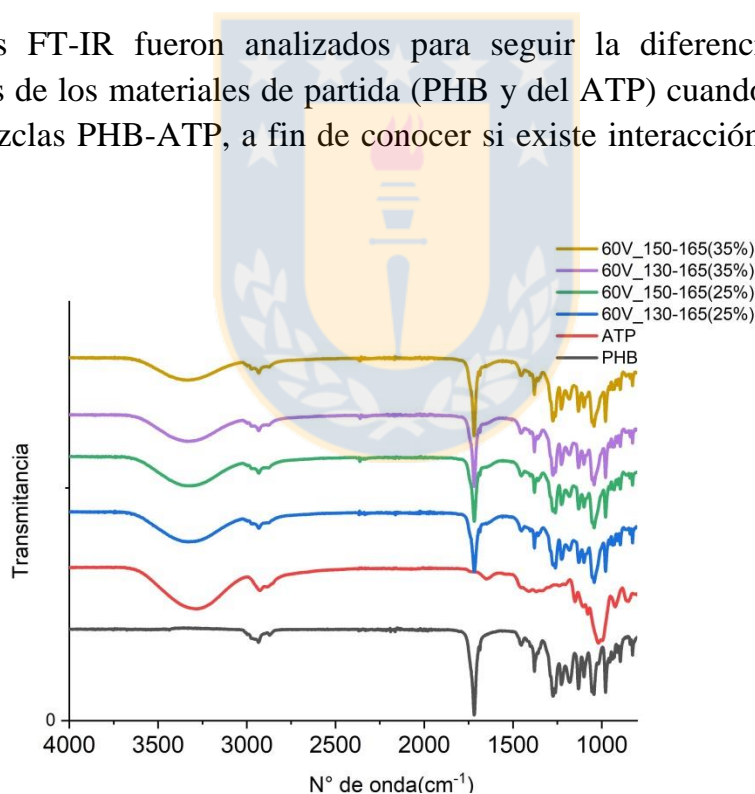


Figura 4.8. Espectros FT-IR para almidón termoplástico, PHB y mezcla de PHB/ATP a diferentes temperaturas y concentraciones. Fuente: elaboración propia.

En la figura 4.8 muestra el pico característico a  $1700\text{ cm}^{-1}$  del PHB, que corresponde a las vibraciones de los grupos carbonilos ( $-\text{C}=\text{O}$ ) el cual es característico del PHB, por otra parte, el almidón termoplástico presenta un pico característico

correspondiente a las vibraciones del grupo hidroxilo (-O-H) que aparece a  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Tanto el PHB como el ATP presentan un pico aproximadamente a  $2900\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a las vibraciones  $-\text{Csp}^3\text{-H}$ . Cuando se analizan los espectros de las mezclas PHB-ATP obtenidas a una misma velocidad de mezclado, pero a diferentes temperaturas y concentraciones de ATP estudiadas, se puede observar que todas presentan el pico característico del PHB ( $1700\text{ cm}^{-1}$ ) y del ATP ( $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ ) y en todos los casos estos picos presentan una disminución en su intensidad y el pico atribuido a las vibraciones -O-H del ATP se desplazó a valores más altos. La diferencia en la intensidad y el desplazamiento de estos picos característicos en las mezclas es atribuida a la interacciones intermoleculares entre el grupo hidroxilo del almidón y el grupo carbonilo del PHB.<sup>118</sup>

La presencia del talco fue confirmada por SEM con detector EDS (detector de energía dispersiva). El espectro EDS presenta los picos característicos de magnesio y silicio presentes en la muestra (figura 4.9).

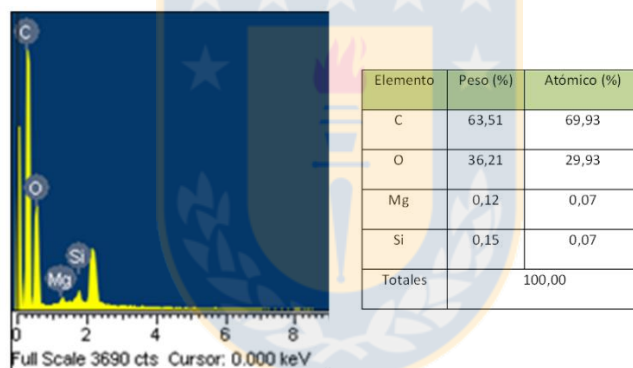


Figura 4.9. Análisis de elementos por SEM/EDS para PHB. Fuente: elaboración propia.

Por DRX se analizaron los difractogramas del PHB y de la mezcla PHB-ATP. La figura 4.10 muestra la presencia de tres picos intensos a  $2\theta=9,46^\circ$  y  $28,6^\circ$ . Estos picos no son característicos del PHB y son atribuidos al 1% de talco que posee el PHB comercial y un 30 %m/m de plastificante (ácido cítrico).

El difractograma del PHB (figura 4.10) muestra picos característicos a  $16,9^\circ$  (020),  $18,9^\circ$  (110),  $21,3^\circ$  (101) y  $22,6^\circ$  (111)<sup>91,119</sup> con sus respectivos índices de Miller (planos cristalográficos). Los picos característicos del PHB disminuyen su intensidad cuando se obtiene la mezcla. Esta diferencia se explica con la relación de intensidad de los planos (020)/(110), que para el PHB tiene un valor de 1,20 y para la mezcla de 1,35. El aumento en la relación significa que la estructura cristalina del PHB ha sido perturbada como consecuencia de la formación de enlaces hidrógeno.<sup>118</sup>

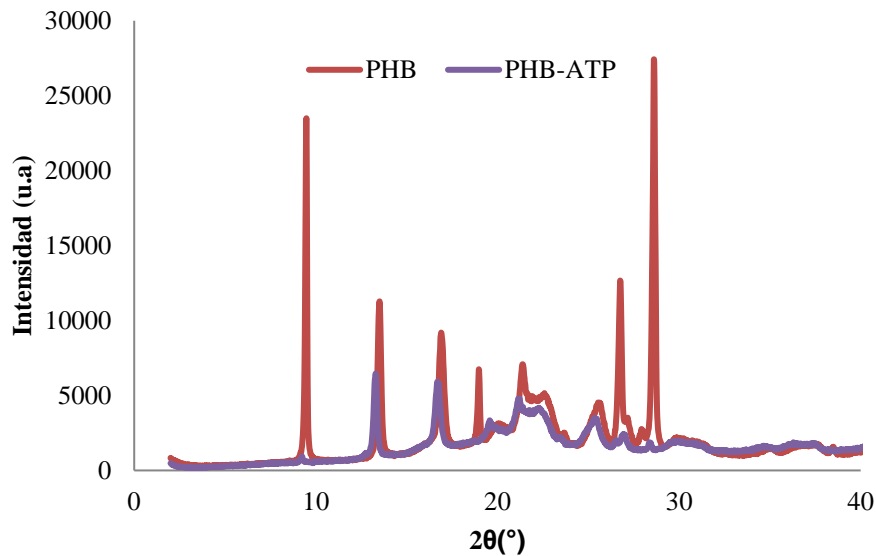


Figura 4.10. Difractograma para PHB y para la mezcla PHB-ATP (65-35 % m/m). Fuente: elaboración propia.

En los difractogramas de PHB y PHB-ATP muestra una disminución de la intensidad de los picos relacionados con la carga talco asociada en la mezcla PHB-ATP, la que sería atribuida a que el ATP se intercalaría entre las capas de talco dispersándolas totalmente.

Para analizar la superficie del material se tomaron imágenes mediante SEM para las mezclas PHB-ATP. La figura 4.11 muestra las microfotografías de las mezclas PHB-ATP obtenidas utilizando la misma velocidad de mezclado, pero variando la temperatura de procesado y la concentración de ATP. Las figuras 4.11 a) y c) corresponden a mezclas con diferentes concentraciones de ATP pero igual velocidad. Se observó que una gran parte de la superficie es lisa y uniforme, con muy poca presencia de gránulos de almidón. La figura 4.11 b) se diferencia de la figura a) que la primera temperatura de procesamiento es mayor en 20 °C lo que parece afectar la superficie, ya que, si bien no existe presencia de gránulos de almidón, parece presentar fisuras. Algo parecido ocurre en la figura 4.11 d) que la superficie pareciera presentar como una sobre capa líquida, lo que podría atribuirse a que algunas muestras luego de un tiempo, presentaban cierta exudación. Por su consistencia fue atribuida a la presencia de glicerina en el material.

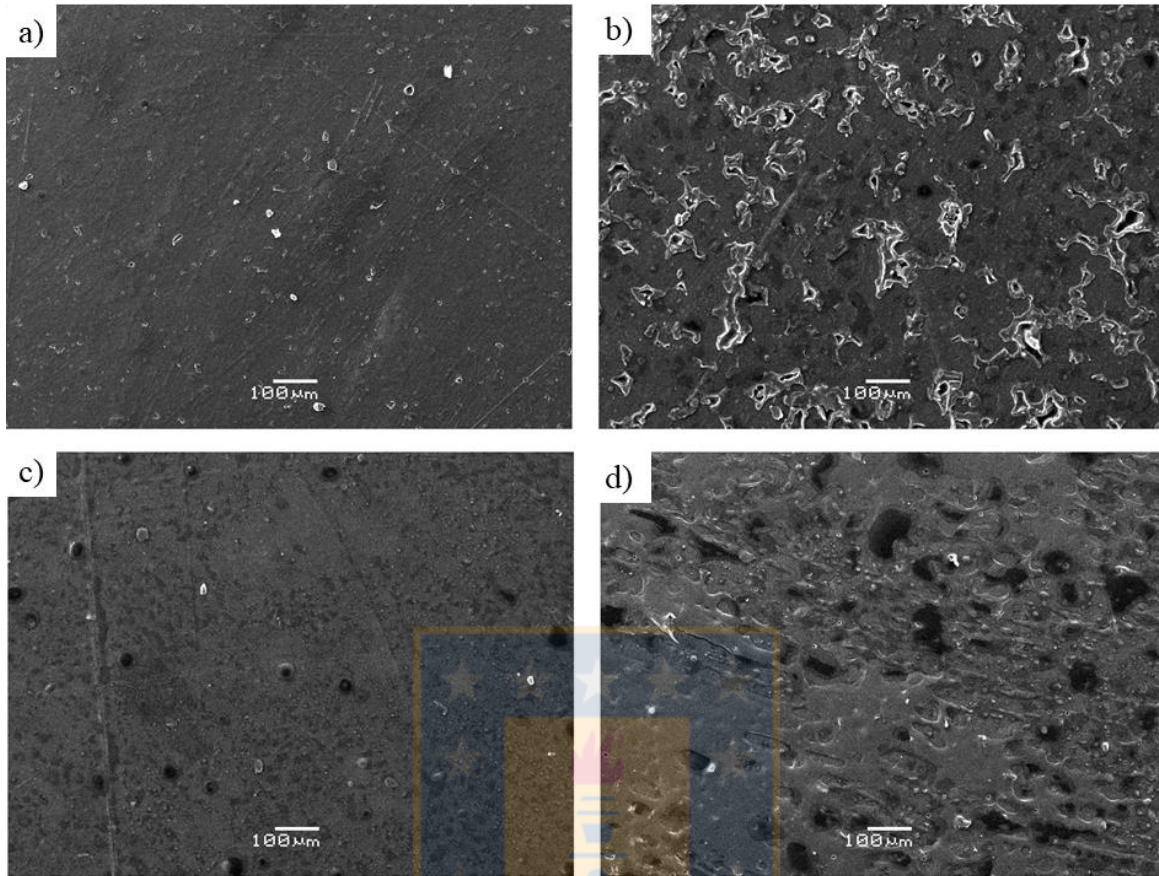


Figura 4.11. Microfotografías SEM para las mezclas PHB-ATP a) 60V\_130-165(25%), b) 60V\_150-165(25%), c) 60V\_130-165(35%) y d) 60V\_150-165(35%). Fuente: elaboración propia.

#### 4.2.3 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas fueron analizadas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) con el fin de analizar la influencia de variables, tales como concentración, temperatura y velocidad de mezclado en las propiedades térmicas.

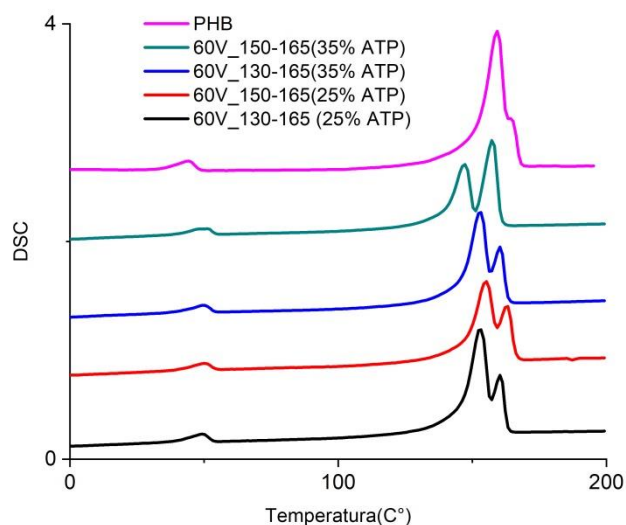


Figura 4.12. Termogramas del segundo calentamiento, para PHB (—), las mezclas PHB-ATP(75:25) con  $T_1$  de 130 °C (—), con  $T_1$  de 150 °C (—), las mezclas PHB-ATP(65:35) con  $T_1$  de 130 °C (—) y con  $T_1$  de 150 °C (—). Velocidad 60 rpm y zona 2 con 165 °C. Fuente: elaboración propia.

Los termogramas de la figura 4.12 presentan la misma velocidad de mezclado (60 rpm), pero diferentes temperaturas de mezclado. Se observa que todas las mezclas analizadas muestran dos picos endotérmicos, correspondientes al proceso de fusión cristalina durante el proceso de fusión. Esto se atribuye al fenómeno de recristalización, que como consecuencia produce un tamaño bimodal de los cristalitas.<sup>120</sup> En la figura 4.12 se observa un pico a 50 °C (transición de tipo secundaria), que se atribuye a la presencia de aditivos de bajo peso molecular (estabilizante o lubricante) que posee el PHB comercial,<sup>91</sup> el cual no presenta cambios.

Tabla 4.3. Propiedades térmicas (DSC y TGA) para PHB y mezclas PHB-ATP.

Exp N°	T <sub>f1</sub> (°C)	T <sub>f2</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	Grado de cristalinidad* (%)	T <sub>d</sub> (°C)
1	152,7	160,2	105,5	66,84	53,46	61,0	300,9
2	155,4	158,2	105,1	54,21	49,56	49,5	303,3
3	155,0	162,2	103,4	55,94	50,55	51,1	301,7
4	151,5	159,2	102,1	58,98	51,64	53,9	301,4
5	153,2	160,2	103,6	56,48	47,91	51,6	301,0
6	151,4	159,3	103,1	65,61	54,87	59,9	301,7
7	151,8	160,2	101,3	62,72	51,96	57,3	302,1

<b>8</b>	149,2	158,2	100,9	53,32	42,29	48,7	302,2
<b>9</b>	152,8	160,3	104	59,64	49,01	62,8	300,8
<b>10</b>	152,4	159,2	102	44,39	37,5	46,8	303,9
<b>11</b>	146,2	157,2	99,3	58,13	50,78	61,2	302,4
<b>12</b>	154,2	160,2	101,3	54,18	47,82	57,1	303,3
<b>13</b>	150,0	158,3	101,8	51,67	42,08	54,4	301,7
<b>14</b>	152,6	160,2	101,2	41,03	34,59	43,2	303,5
<b>15</b>	152,6	160,3	101,2	55,11	49,45	58,1	302,6
<b>16</b>	151,6	159,2	100,3	45,65	39,5	48,1	300,5
<b>17</b>	154,6	160,2	102,5	68,25	61,69	66,8	301,3
<b>18</b>	153,7	161,2	101,2	61,62	52,77	60,3	300,2
<b>PHB</b>	163,2		109,9	79,2	71,19	54,2	289,6

\*La cristalinidad se determinó de la siguiente forma <sup>121</sup>

$$\text{Cristalinidad (\%)} = \frac{\Delta H_f}{X_{\text{PHB}} \Delta H_{f \text{ 100\% PHB}}} \cdot 100$$

$X_{\text{PHB}}$  = es la fracción en peso del PHB

$$\Delta H_{f \text{ PHB}} = 146 \text{ J/g}^{122}$$

En la tabla 4.3 se observa que la temperatura de fusión (Tf) de las mezclas disminuye aproximadamente un 8% con respecto al PHB, lo cual podría ser atribuido a que se produce una separación de fases.<sup>123</sup> Con respecto al grado de cristalinidad el PHB posee una alta cristalinidad (54%), y las mezclas analizadas presentaron valores cercanos al PHB, obteniéndose un mínimo de cristalinidad de un 43% y máximo de 66% para la mezcla con una velocidad de procesamiento de 80 rpm y una concentración de ATP de un 30 %m/m, que en su mayoría tienen un grado de cristalinidad menor que la del PHB. El aumento de la cristalinidad en las mezclas es atribuido a que el almidón actúa como agente nucleante, lo que permite una mayor formación de cristales.<sup>118</sup>

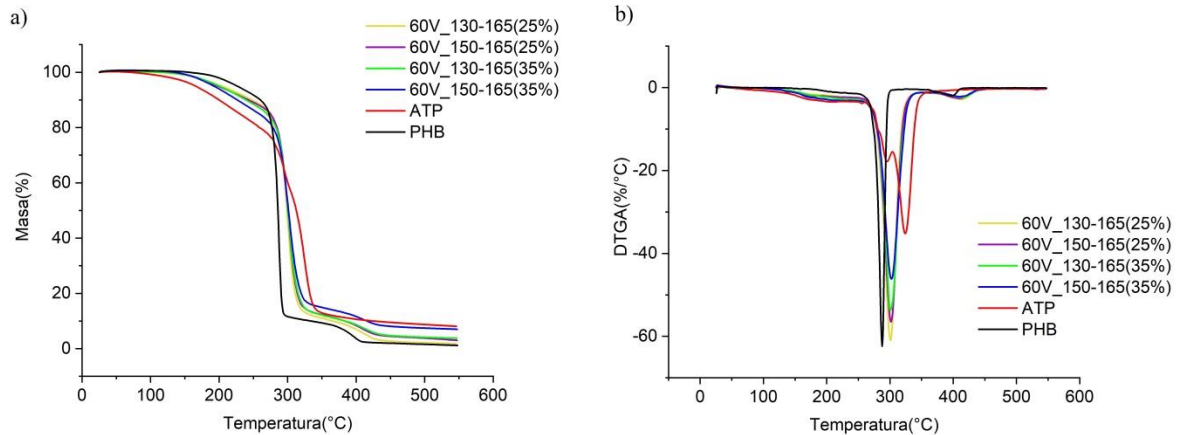


Figura 4.13. a) Perfil de descomposición térmica y b) es la derivada de la pérdida de masa para el PHB, ATP y las mezclas PHB-ATP obtenidas a una velocidad de mezclado de 60 rpm y a diferentes temperaturas y concentraciones de ATP. Fuente: elaboración propia.

En la figura 4.13 se muestra el perfil de descomposición para el PHB, ATP y las mezclas PHB-ATP. Se observa que el PHB presenta 2 etapas de descomposición la primera a 289 °C atribuida a la descomposición del PHB y la segunda a 400 °C aproximadamente atribuida a la descomposición del aditivo (plastificante) del PHB comercial. En el caso del ATP se observó un comportamiento peculiar ya que se pueden ver dos procesos de descomposición la primera cercana a 296 °C y la segunda que es la que siempre presenta a 325 °C correspondiente a la descomposición del almidón de maíz. En todas las mezclas PHB-ATP se observan dos procesos de descomposición la primera cercana a 300 °C que correspondería a la descomposición de la mezcla PHB-ATP, mientras que la segunda corresponde a la descomposición del aditivo del PHB comercial.

Para las mezclas con ATP se observa que la masa de las mezclas comienza a disminuir desde los 100 °C, atribuible a la pérdida de agua retenida. Por otro lado, la temperatura de descomposición ( $T_d$ ) de las mezclas se incrementó hasta 303 °C, lo anterior atribuido a la formación de enlaces hidrógenos entre el almidón y el PHB, los cuales probablemente contribuyen a inhibir el paso principal para la descomposición del PHB que consiste en la formación de un “anillo”<sup>124</sup> (ver figura 4.14).

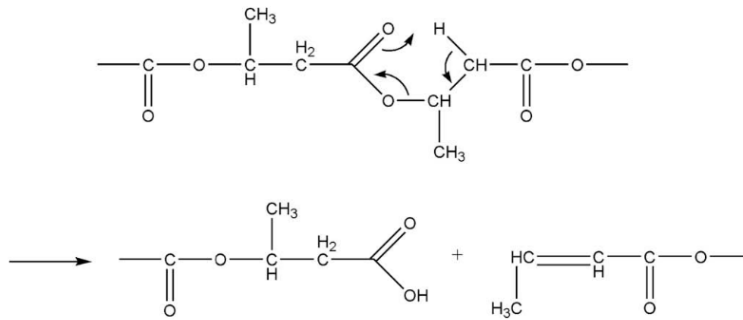


Figura 4.14. Reacción de degradación PHB.<sup>124</sup>

### 4.3 Obtención de bionanocompuesto

Con los resultados obtenidos de estudio anterior se define que la mezcla PHB-ATP quedaría fija en una concentración 65:35 respectivamente, ya que fue la concentración con las mejores propiedades mecánicas (figura 4.7), térmicas (tabla 4.3) y morfológicas (figura 4.11) .

La obtención de bionanocompuesto se realizó en el laboratorio de la Dra. Raquel S. Mauler (UFRGS) en un mezclador interno, con una zona de temperatura y una capacidad mínima de 50 gramos. Para la obtención de los bionanocompuesto se utilizó arcilla Montmorillonita modificada con un 25-30% con metildihidroxietil amonio (OMMT).

#### 4.3.1 Diseño de experimento, definición de parámetros

Para tener una visión de cómo se comportan las propiedades de los bionanocompuestos se evaluó la influencia de las variables presentes en la formulación de los bionanocompuestos (concentración de arcillas) y de los parámetros de proceso (velocidad y tiempo) analizando como respuesta el módulo elástico. La concentración de arcilla se estudió entre 1 y 5% m/m, la velocidad de mezclado entre 80 y 120 rpm y el tiempo de mezclado entre 5 y 10 min. Se realizó un diseño experimental de tipo factorial completo (FFD) de dos niveles ( $2^3$ ). En la tabla 4.4 se presentan los valores definidos por el diseño de experimento con su respectiva respuesta, para el cual se determinó un número de 12 experimentos.

Tabla 4.4. Número de experimentos realizados según el diseño de experimento FFD con su respectiva respuesta (módulo elástico) para las diferentes bionanocompuestos.



Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Concentración Arcilla (%m/m)	Módulo elástico (MPa)
80 (-1)	5(-1)	1(-1)	486,9
120(+1)	5(-1)	1(-1)	490,8
80(-1)	10(+1)	1(-1)	331,3
120	10(+1)	1(-1)	138,4
80(-1)	5(-1)	5(+1)	455,8
120(+1)	5(-1)	5(+1)	452,5
80(-1)	10(+1)	5(+1)	354,4
120(+1)	10(+1)	5(+1)	356,6
100(0)	7,5(0)	3(0)	383,9
100(0)	7,5(0)	3(0)	438,3
100(0)	7,5(0)	3(0)	463,5
100(0)	7,5(0)	3(0)	421,3

El modelo estadístico se evaluó utilizando el test ANOVA y test falta de ajuste. Por el test ANOVA se determinó que el modelo de regresión tiene un  $p < 0,000$  lo que significa que es un modelo satisfactorio y confiable. En cuanto a la falta de ajuste presenta un  $p > 0,05$  ( $p = 0,945$ ), este valor indica que el modelo no tiene falta de ajuste, por lo que de esta forma el modelo estadístico se encuentra validado por el test ANOVA. Lo siguiente fue evaluar el modelo obtenido por regresión lineal múltiple (MLR), los parámetros obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4.5. Parámetros obtenidos para evaluar el modelo obtenido por MLR.

Parámetros del modelo	Valor
R <sup>2</sup>	0,98
Q <sup>2</sup>	0,96
Validez del modelo	0,98
Reproducibilidad	0,92

Como todos los valores se encuentran próximos a uno, quiere decir que nuestro modelo estadístico se encuentra validado por MLR, por lo que se puede interpretar los datos entregados por el software MODDE 7.

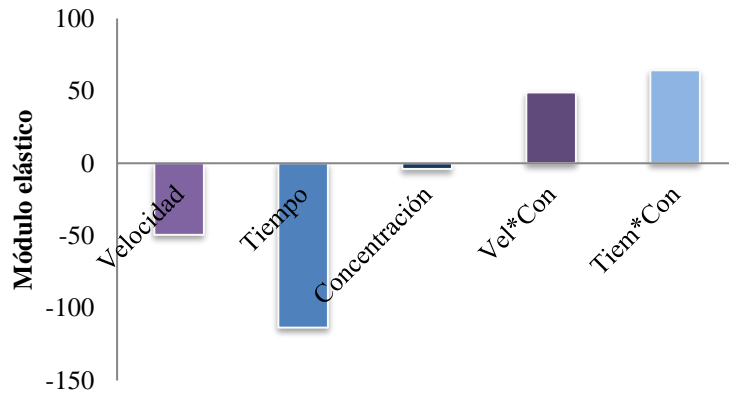


Figura 4.15. Coeficientes del polinomio obtenidos para el Módulo elástico. Fuente: elaboración propia.

De las tres variables analizadas (ver figura 4.15), el tiempo de mezclado presenta un mayor impacto sobre el módulo elástico, luego viene la velocidad. La concentración de arcilla es el único parámetro que no tiene efecto significativo por si solo sobre la respuesta, pero sí presenta una interacción importante con la velocidad y el tiempo de mezclado, por esta razón no puede ser descartada.

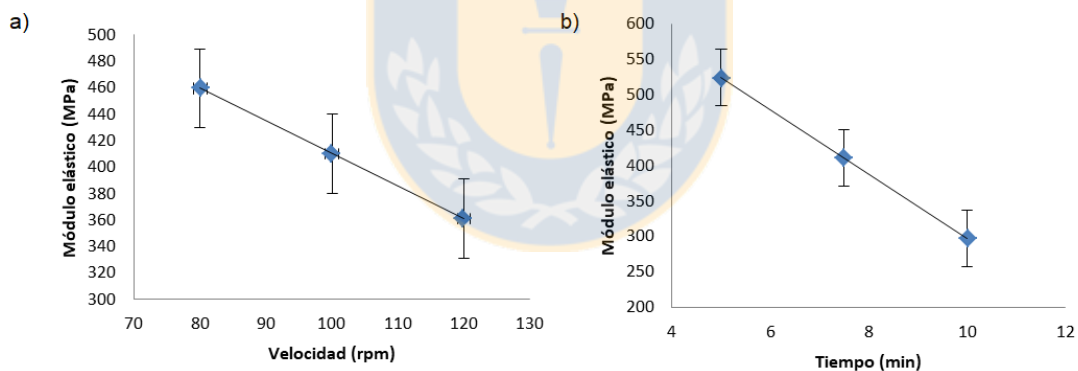


Figura 4.16. Efecto de las variables sobre el módulo elástico, a) velocidad de mezclado y b) tiempo de mezclado. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.16 muestra que a menores velocidades de mezclado se obtienen mayores módulos elásticos. Esto sería atribuido a que a menores velocidades existiría una mayor dispersión de la arcilla, ya que la arcilla mejora el módulo elástico a través de mecanismos de refuerzos, limitando el movimiento molecular de las cadenas del polímero.<sup>125</sup>

La figura 4.17 muestra como interaccionan las variables (velocidad-concentración y tiempo-concentración) frente a la respuesta. Por lo cual se determinó que para un

material polimérico con alto módulo elástico se debe utilizar bajas concentraciones de arcilla y bajas velocidades de mezclado. En el caso de la interacción velocidad-concentración se determina que a alta concentraciones la velocidad no influye significativamente en el módulo elástico.

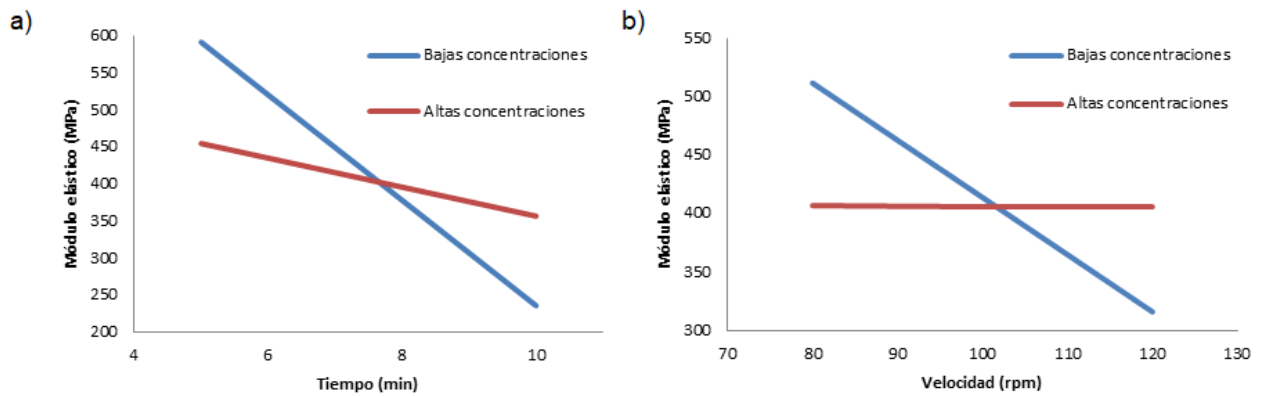


Figura 4.17. Gráficos de interacciones para concentración de arcilla a) Tiempo y b) Velocidad para su efecto frente al módulo elástico. Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, se realizó el análisis de las variables estudiadas. Por metodología de superficie respuesta (*Response Surface Methodology*, RSM) se analizó el efecto de las variables en la respuesta. La figura 4.18 muestra los gráficos de contorno 2D, en que ambos gráficos poseen líneas torcidas las cuales indican que los parámetros analizados tienen cierto grado de interacciones entre ellos. Estos gráficos predicen los valores del módulo elástico que se pueden encontrar en el rango estudiado, donde tal como hemos concluido con anterioridad a menores velocidades, menor concentración de arcilla y menor tiempo de mezclado se obtienen mayores módulos elásticos.

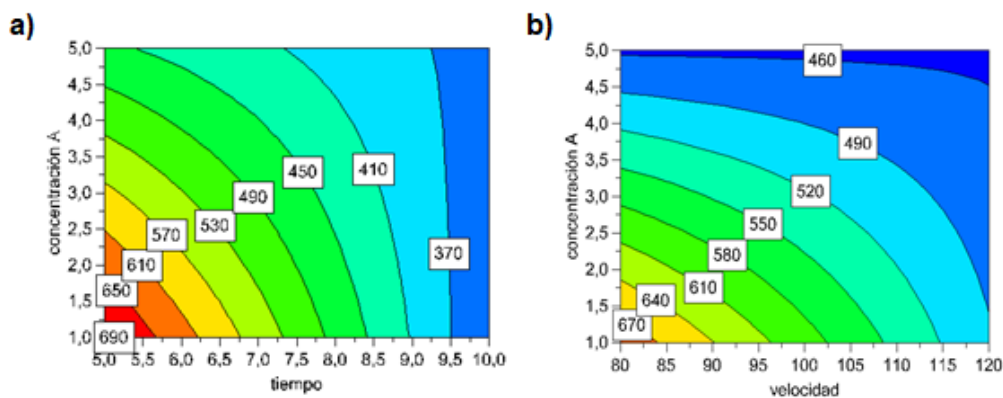


Figura 4.18. Gráfico de contorno 2D con los valores predichos por el modelo estadístico RLM, a) concentración de arcilla (%m/m) versus Tiempo (min), con la

velocidad fija a 80 rpm y b) concentración de arcilla (%m/m) versus Velocidad (rpm), con el tiempo fijo a 5 min. Fuente: elaboración propia.

Tal como se ha analizado a mayores tiempos de mezclado se obtienen módulos bajos. Para explicar ese comportamiento se analizó la curva torque (fuerza que se necesita para producir una rotación alrededor de un punto) versus tiempo la cual permite obtener la energía mecánica, que se asocia directamente con la viscosidad del material.<sup>126</sup> Este análisis se llevó a cabo ya que el mezclador interno (HAKKE) utilizado monitorea los cambios asociado al procesamiento de la muestra. Tal como se observa en la figura 4.19 es un ejemplo las curvas obtenidas utilizando un mezclador interno HAKKE.

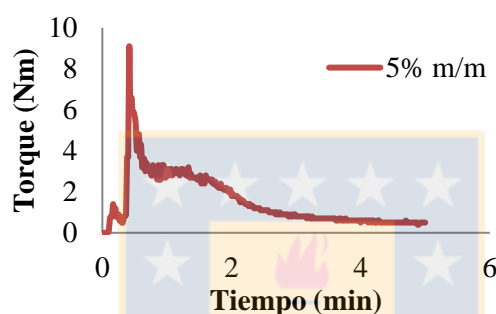


Figura 4.19. Curva torque versus tiempo para el bionanocompuesto PHB-ATP/Arcilla (5 %m/m, 5 min y 80 rpm). Fuente: elaboración propia.

La figura 4.19 muestra que mayores tiempos de procesamiento producen un menor torque estabilizado, por lo tanto, menor es la energía mecánica y por ende menor viscosidad, esto se puede observar en la tabla 4.6 donde se muestran las energías mecánicas para todas las muestras.

Tabla 4.6. Torque estabilizado y energía mecánica para los diferentes bionanocompuestos PHB-ATP/Arcilla.

Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	concentración Arcilla (%m/m)	Torque estabilizado (Nm)	Energía mecánica* (kj/kg)
80	5	1	0,3	50,2
120	5	1	0,2	50,3
80	10	1	~0	~0
120	10	1	~0	~0
80	5	5	0,4	67,04
120	5	5	0,5	125,7
80	10	5	0,1	16,8

120	10	5	0,2	50,28
100	7,5	3	0,2	41,9
100	7,5	3	0,2	41,9
100	7,5	3	0,3	62,82
100	7,5	3	0,3	62,82
80	5	0	0,7	117,3

\*La energía mecánica se determinó con la siguiente ecuación:

$$Em = \left(\frac{N}{M}\right)S$$

Donde N es la velocidad de mezclado en rad/seg, M es la masa en Kg y S es el torque estabilizado.

En la tabla 4.6 se observa que la energía mecánica depende de la velocidad de mezclado y del tiempo de mezcla, ya que a mayores velocidades de mezclado y menores tiempo de mezclado se obtiene una mayor energía mecánica, pero a mayores tiempo de mezclado (10 min) la energía mecánica disminuye hasta aproximadamente cero, lo que conlleva a una baja viscosidad, esto como una posible consecuencia de la degradación del PHB, la cual se produce por las sales de amonio cuaternario presentes en la arcilla montmorillonita modificada.<sup>124,127,128</sup>

Los surfactantes de las arcillas se pueden descomponer de dos formas cuando se trabaja a temperaturas cercanas a 170 °C. Por una eliminación de Hofmann o mediante un ataque nucleofílico del contraión del amonio cuaternario (ver figura 4.20). En el primer caso se convierte la sal de amonio cuaternario en una amina, lo que libera un alqueno y un protón. Este último podría facilitar la división de la cadena mediante una reacción catalizada por ácido.<sup>124</sup> En el segundo caso ocurre un ataque nucleofílico del cloruro (contraión) sobre el amonio cuaternario produciendo cloroalcanos y una amina terciaria,<sup>128</sup> permitiendo la fragmentación de la cadena de PHB.<sup>129</sup>

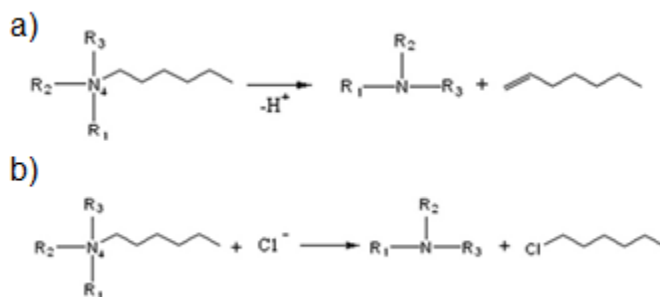


Figura 4.20. a) Eliminación de Hofmann y b) ataque nucleofílico de un cloruro (contra ión).<sup>128</sup>

Analizados los resultados del diseño de experimentos se determinó analizar las propiedades morfológicas, térmicas y mecánicas de los bionanocompuestos con una concentración de 1 y 5% m/m de arcilla y una velocidad de 80 rpm.

### 4.3.2 Análisis Morfológico de los bionanocompuestos

Para comprobar la existencia de los bionanocompuestos se realizó difracción de rayos X (DRX) a los diferentes bionanocompuesto, al PHB y a las mezclas PHB-ATP. Se utilizó un difractómetro Bruker AXS D4 Endeavor con una radiación de CuK ( $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ ) y un tubo X-ray operado a 40 kV y 20 mA. La velocidad de barrido fue de  $1^\circ \text{ min}^{-1}$  y se abarco un rango  $2\theta$  entre  $2$  y  $10^\circ$ , que es donde aparece el pico característico de la arcilla, dependiendo de si el pico de arcilla se desplaza o desaparece en este rango significa que existe una morfología intercalada o exfoliada.

De la figura 4.21 se determinó la distancia interlaminar de las capas de arcilla según la Ley de Bragg ( $n\lambda = 2d \text{ Sen } \theta$ ), la que corresponde a una distancia de  $18,5 \text{ \AA}$  (para el pico característico de la arcilla a  $4,73^\circ$ ). En los difractogramas de los bionanocompuestos no aparece este pico de la arcilla, lo indicaría que la mezcla de polímeros se intercaló entre las capas de arcilla dispersándolas totalmente. Por esta razón no se observaría la señal en los bionanocompuestos obtenidos a diferentes velocidades de mezclado, tiempos de mezclados y de diferentes concentraciones de arcillas. Este resultado indica la obtención de una morfología exfoliada para los bionanocompuesto. El pico intenso a  $9,46^\circ$  es atribuido al 1% de talco que posee el PHB comercial.

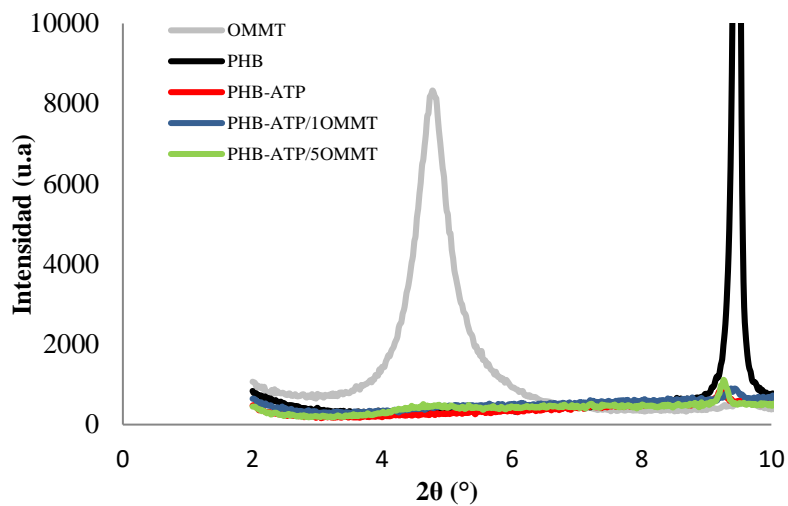


Figura 4.21. Diffractogramas para la arcilla montmorillonita modificada (OMMT), PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos con 1 y 5 %m/m de arcilla. Fuente: elaboración propia.

Se tomaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para corroborar los resultados obtenidos por DRX. La figura 4.22 a) muestra las microfotografías del bionanocompuesto con 5% m/m de arcilla en la cual se observan las capas de arcillas totalmente exfoliada ya que se ven líneas aisladas, a diferencia de la imagen b) donde se observan las capas de arcilla ordenadas indicando una morfología intercalada. Además algunas capas de arcilla aislada, indicando que los bionanocompuestos pueden presentar ambas morfologías.

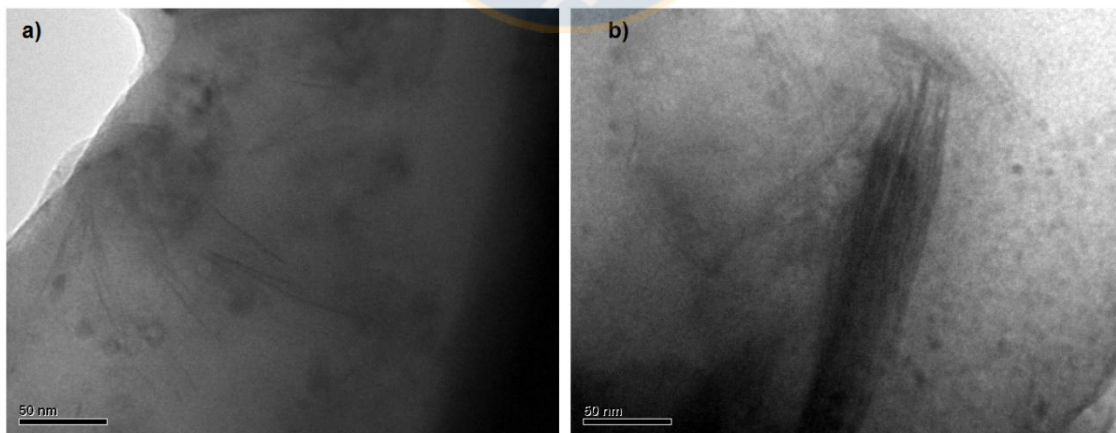


Figura 4.22. Microfotografías obtenidas por TEM para el bionanocompuesto con 5% masa de arcilla a) morfología exfoliada y b) morfología intercalada. Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, la superficie de los bionanocompuestos se analizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). La figura 4.23 a y b), muestran una superficie lisa la cual corresponde a la cara frontal de la película de bionanocompuestos con 1 y 5% en masa de arcilla. Al analizar el corte transversal del bionanocompuesto con 1 % m/m de arcilla (ver figura 4.23 c) se observan gránulos de almidón nativo como los de la imagen f. Por otra parte, los bionanocompuestos con 5 % m/m de arcilla (ver figura d) no presentan gránulos, pero sí se observan láminas que podrían corresponder a las capas de arcilla. La ausencia de gránulo en los bionanocompuesto con una mayor concentración de arcilla podría ser atribuida a la capacidad como agente compatibilizante y reforzante que posee la arcilla en mezclas de polímeros inmiscibles.<sup>130,131</sup>

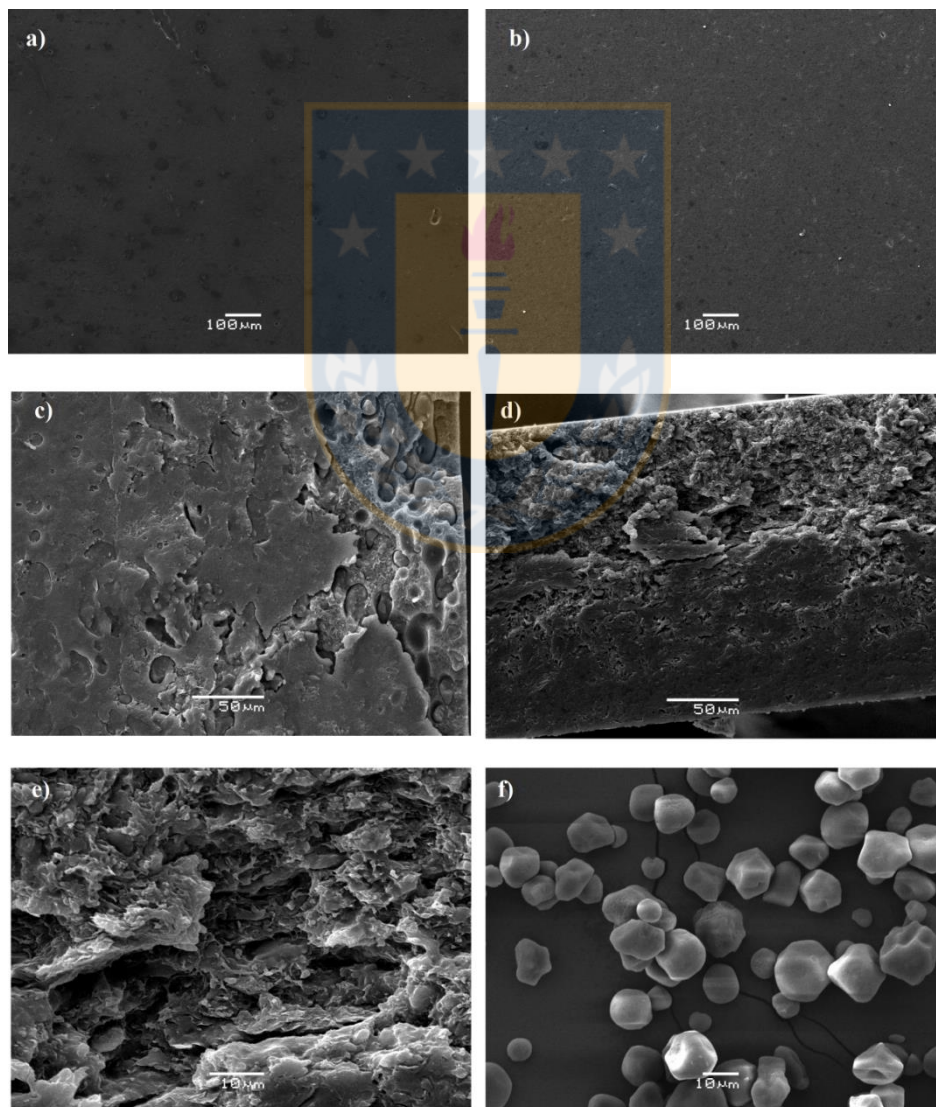




Figura 4.23. Microfotografía SEM de la superficie del bionanocompuesto a) PHB-ATP/1OMMT y b) PHB-ATP/5OMMT, las microfotografías c) y d) son cortes transversales a la película de los bionanocompuesto PHB-ATP/1OMMT y PHB-ATP/5OMMT respectivamente. La microfotografía e) es un aumento de la microfotografía d) y f) el almidón nativo. Fuente: elaboración propia.

Otro estudio para analizar la superficie (topografía y la rugosidad superficial) de los bionanocompuesto es mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). La figura 4.24 corresponde a las imágenes topográficas 3D obtenidas por AFM para el polímero PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos con 1 y 5 %m/m de arcilla.

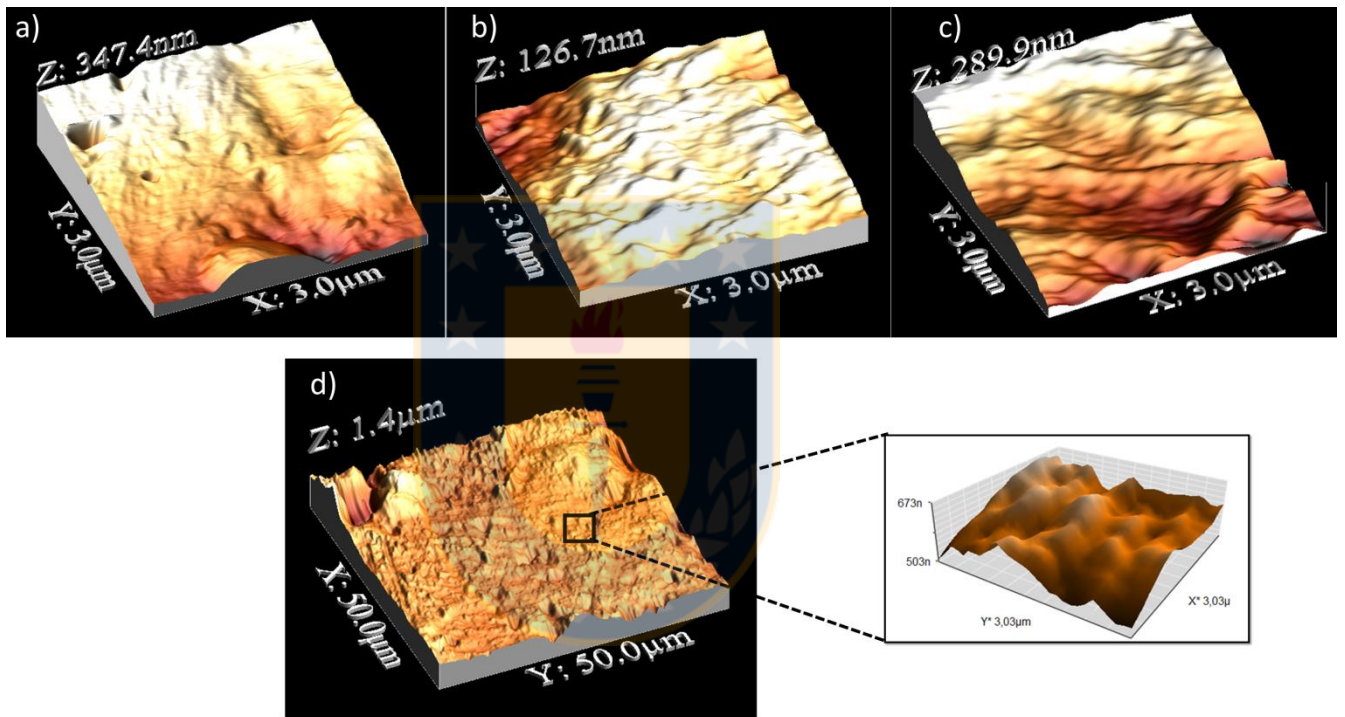


Figura 4.24. Imagen topográfica 3D obtenida por microscopía de fuerza atómica para a)PHB, b) PHB-ATP, c) PHB-ATP/1\_OMMT y d) PHB-ATP/5\_OMMT. Fuente: elaboración propia.

La topografía de PHB y de las mezclas PHB-ATP presentan superficies suaves con pequeños relieves (ver figura 4.24 a y b). En el caso de los bionanocompuestos (ver figura c y d) presentan una superficie con surcos definidos los que son más pronunciados para el bionanocompuesto con un 5% de arcilla, esta diferencia en la superficie se asocia a la rugosidad de los materiales.

Los valores de rugosidad superficial obtenido por AFM se muestran en la tabla 4.7. Se observa que el contenido de arcilla aumenta el valor de rugosidad superficial en

los bionanocompuestos, esto es atribuido a que la capas de arcilla migran a la superficie debido a factores tales como el tamaño, la movilidad, las funcionalidades de grupo final, composición relativa, interacciones o a aglomeraciones de las capas de arcilla.<sup>132</sup>

En este caso la arcilla montmorillonita se encuentra modificada con un surfactante que posee dos grupos hidroxilos, el que debería presentar interacciones débiles con el PHB o con el ATP. Por lo tanto los valores de rugosidad de los bionanocompuestos con un 1% de arcilla presenten una mejor dispersión en el polímero<sup>133</sup> lo que evita las aglomeraciones que son las responsables que las capas de arcilla migren hacia la superficie, de tal forma que su rugosidad no aumenta drásticamente con respecto al PHB o la mezcla. Por lo tanto, esta propiedad explicaría por qué el bionanocompuesto con 5% de arcilla presenta una 50% más de rugosidad que el bionanocompuesto con un 1% de arcilla.

Tabla 4.7. Rugosidad superficial para PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT.

Muestra	Rugosidad Superficial (nm)
PHB	14,53±6,75
PHB-ATP (65:35)	12,60±0,028
PHB-ATP/1OMMT	17,77±0,92
PHB-ATP/5OMMT	30,88±5,88

### 4.3.3 Propiedades térmicas

Se analizaron las propiedades térmicas de los diferentes bionanocompuestos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se determinó la temperatura de fusión ( $T_f$ ), entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ), temperatura de cristalización ( $T_c$ ), entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) y grado de cristalinidad ( $X_c$ ). También se realizaron análisis termogravimétricos (TGA) en que se obtuvo parámetros como temperatura de descomposición ( $T_d$ ), temperatura cuando se ha perdido un 5%, 10% y un 50% en masa ( $T_{5\%}$ ,  $T_{10\%}$ ,  $T_{50\%}$ ).

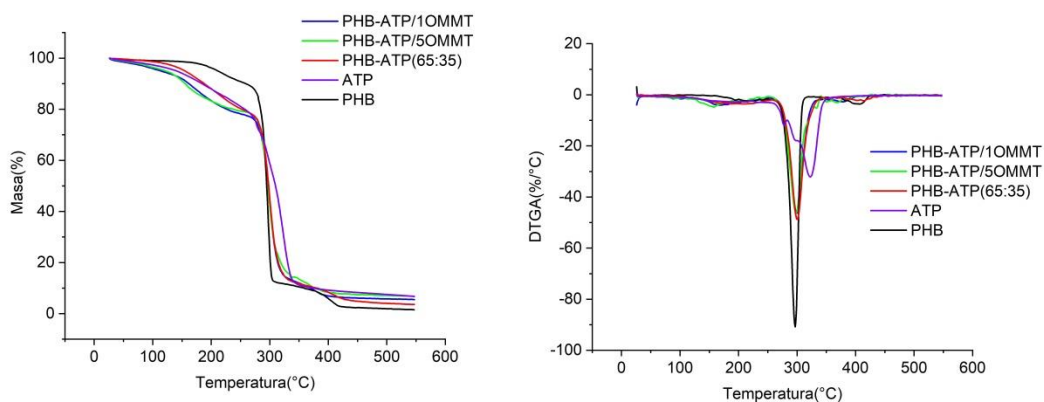


Figura 4.25. Perfil de descomposición y derivada del perfil de descomposición para PHB, ATP, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT con 1 y 5% m/m de arcilla. Fuente: elaboración propia.

Mediante Análisis termogravimétrico (TGA) se obtuvo el perfil de descomposición para PHB, ATP, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT con 1 y 5% m/m de arcilla (figura 4.25). El PHB muestra dos etapas de descomposición, la primera atribuida a la descomposición del PHB (296,7 °C) y la segunda a la descomposición de algún aditivo que contiene el PHB comercial.<sup>91</sup>

Las curvas de descomposición de la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos muestran 3 etapas de descomposición, la primera etapa que se encuentra entre 100 y 180 °C se atribuye a la pérdida de agua presente en la mezcla correspondiente al ATP. Algunos autores describen que la degradación térmica del almidón termoplástico se produce por la pérdida de agua la que se libera paulatinamente, ya que primero se pierde el agua libre, segundo el agua débilmente unida y finalmente el agua unida<sup>134,135</sup> (ver figura 4.26), esta degradación por pérdida de agua llega hasta 120 °C. La segunda etapa corresponde a la descomposición de la mezcla PHB-ATP<sup>104</sup> (299,5 °C) y la tercera etapa de descomposición corresponde al aditivo.

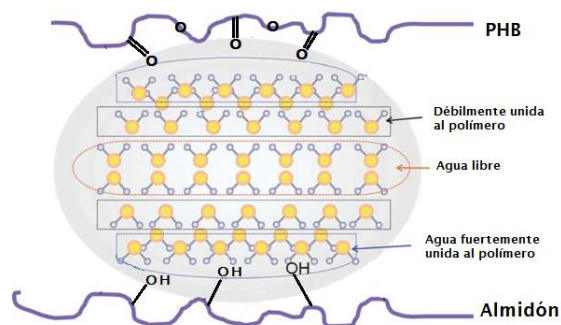


Figura 4.26. Esquema de la afinidad de las moléculas de agua con las cadenas poliméricas.<sup>135</sup>

En la tabla 4.8 se muestran las temperaturas de descomposición de los bionanocompuestos cuando hay una pérdida de 5% y 10% ( $T_{5\%}$  y  $T_{10\%}$ ) en masa, estas tienen una disminución significativa con respecto al PHB. La que es atribuida al almidón termoplástico (almidón de maíz, glicerina y agua), que tal como se describió anteriormente presentan una pérdida de agua, además algunos autores han determinado que a 180 °C también comienza a evaporarse glicerol,<sup>136</sup> por lo tanto estos factores se ven reflejados al analizar estos dos parámetros ( $T_{5\%}$  y  $T_{10\%}$ ).

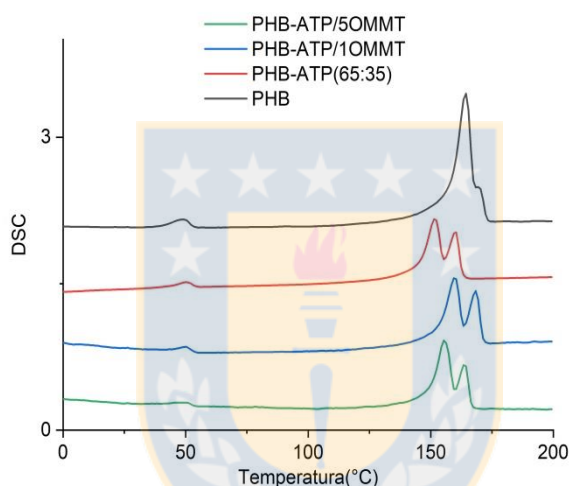
Con respecto a las temperaturas cuando existe una pérdida del 50% en masa las temperaturas se mantienen constantes en un valor cercano a 298 °C por lo que los bionanocompuestos no presentan cambios significativos con respecto a la mezcla PHB-ATP.

Tabla 4.8. Temperatura de descomposición con diferentes porcentajes de pérdida de masas, obtenidas desde las curvas termogravimétricas.

Muestra	Td (°C)	$T_{5\%}$ (°C)	$T_{10\%}$ (°C)	$T_{50\%}$ (°C)
PHB	296,7	210,8	259,0	295,0
PHB- ATP(65:35)	300,1	154,0	188,0	298,0
PHB- ATP/10MMT	299,5	112,9	161,9	296,9
PHB- ATP/50MMT	298,3	121,0	155,0	297,0

Por otra parte, se realizó el análisis de los resultados obtenidos por DSC a los diferentes materiales poliméricos. En la figura 4.27 se observa que los termogramas de los bionanocompuestos son similares a los obtenidos para las mezclas PHB-ATP

ya que presentan un doble pico de fusión, uno a 151 °C y el otro a 160 °C, los cuales están relacionadas con el fenómeno de recristalización que como consecuencia produce la existencia de un tamaño bimodal de los cristalitas de PHB.<sup>120</sup> El primer pico de fusión está relacionado con la fusión de cristalitas menos estables. El segundo pico observado a temperaturas más altas se asocia con la fusión de cristales reorganizados después del segundo calentamiento.<sup>72</sup> Para los bionanocompuestos, también se observan dos temperaturas, en este caso, se puede atribuir a la presencia de placas de arcilla, que dificultan la recristalización y pueden causar una reducción en el tamaño del cristal.<sup>79</sup> Los termogramas muestran una pequeña transición endotérmica a 50 °C atribuible a los aditivos del PHB comercial.<sup>137</sup>



%

Figura 4.27. Termogramas del segundo calentamiento para PHB y para los bionanocompuesto PHB-ATP/Arcilla obtenidos a 80 rpm, 5 min y concentraciones de 1 y 5% m/m de arcilla. Fuente: elaboración propia.

La tabla 4.9 resume las propiedades térmicas del PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos. El PHB muestra una sola  $T_{f1}$  (163 °C) a diferencia de la mezcla PHB-ATP con dos temperaturas ( $T_{f1}$  y  $T_{f2}$ ) las cuales se mantienen cuando se obtiene el bionanocompuesto. La mezcla PHB-ATP muestra una  $T_{f1}$  a 151 °C la que es atribuida a una separación de fases, por la obtención de mezclas inmiscibles.<sup>138</sup> Los bionanocompuestos con 1 y 5 %m/m de arcilla muestran una  $T_{f1}$  de 159 y 155 °C respectivamente, este aumento correspondería a la presencia de arcilla.

En cuanto a la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) la mezcla presenta una  $T_c$  de 102 °C a diferencia del PHB que su  $T_c$  es de 109 °C, esta leve disminución se atribuiría a que el almidón retarda el proceso de cristalización. Por otra parte, el bionanocompuestos

no presentan una diferencia significativa con respecto a la del PHB. El grado de cristalinidad en los bionanocompuestos disminuye en un 4 y 10% con respecto al PHB. Si bien existe una pequeña disminución, hay que considerar que los bionanocompuestos están formados por PHB, ATP y arcilla, por lo que este material polimérico mantiene propiedades muy similares al PHB.

Tabla 4.9. Propiedades térmicas obtenidas por DSC para los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT.

Muestra	T <sub>f1</sub> [°C]	T <sub>f2</sub> [°C]	T <sub>c</sub> [°C]	ΔH <sub>f</sub> [J/g]	ΔH <sub>c</sub> [J/g]	Grado de cristalinidad (%)
PHB	163,2		109,9	79,2	71,2	54,2
PHB-ATP (65:35)	151,5	160	102,3	50,2	42,5	52,9
PHB-ATP/10OMMT	159,6	168,1	105,9	48,7	41,4	51,8
PHB-ATP/5OMMT	155,4	164,2	107,5	44,2	41,3	49,0

\*La cristalinidad se determinó de la siguiente forma.<sup>121</sup>

$$\text{Cristalinidad (\%)} = \frac{\Delta H_f}{X_{PHB} \Delta H_f 100\% PHB} \cdot 100$$

X<sub>PHB</sub>= es la fracción en peso del PHB; ΔH<sub>f PHB</sub>= 146 J/g.<sup>122</sup>

Una técnica más sensible que el DSC para ver las transiciones térmicas de tipo secundarias (T<sub>g</sub>) es el análisis termomecánico dinámico (DMTA). El DMTA se realizó entre -30 °C y 120 °C a una velocidad de 3°C/min. Se utilizó una amplitud de 0,1% y una frecuencia de en 1 Hz para todas las muestras.

La curva tan δ versus temperatura muestra un pico correspondiente a la temperatura de transición vítrea para PHB, PHB-ATP y los bionanocompuesto PHB/ATP/Arcilla con 1 y 5% m/m de arcilla. Estos valores son resumidos en la tabla 4.10. La temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) es el punto en que un material polimérico pasa de una condición rígida a una condición viscosa. El PHB muestra la mayor T<sub>g</sub> (5 °C), mientras que la mezcla y los bionanocompuestos presentan una T<sub>g</sub> menor, lo que disminuye su densidad, dureza y rigidez. La disminución de la T<sub>g</sub> se atribuiría a que el ATP aumenta levemente la movilidad de los segmentos de la cadena de PHB. Con la presencia de arcilla en la mezcla PHB-ATP se esperaba un aumento de la T<sub>g</sub>, ya que las capas de arcillas restringen el movimiento de las cadenas poliméricas,<sup>139, 126</sup> que no se ve reflejado en este estudio.

Tabla 4.10. Valores de transición vítrea obtenido por DMTA.

Muestra	Transición vítrea (Tg)
PHB	5°C
PHB/ATP	3°C
PHB/ATP/1OMMT	4°C
PHB/ATP/5OMMT	3°C

#### 4.3.4 Propiedades Mecánicas

Para analizar propiedades mecánicas como dureza y módulo elástico al PHB, PHB-ATP, los bionanocompuestos PHB/ATP/1OMMT y PHB/ATP/5OMMT se realizó nanoindentación. Es una técnica a escala nanométrica que mide el movimiento de una sonda de diamante en contacto con la superficie del material. La medida se lleva a cabo aumentando paulatinamente la carga de la sonda, por lo que la sonda penetra indentando la superficie. La nanoindentación es sensible al contenido y a la dispersión del nanorelleno, así como a la adhesión interfacial entre el nanorelleno y las matrices poliméricas.<sup>111</sup>

La dureza y el módulo elástico reducido ( $E_r$ ) corresponden al promedio de 90 indentaciones. El módulo elástico ( $E$ ) se calculó utilizando el coeficiente de poisson 0,35 ( $\nu$ ) para PHB,<sup>110</sup> un  $E_i$  (1140 GPa) y un  $\nu_i$  (0,07) correspondiente al indentador utilizado (ecuación 1). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.11.

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \quad (1) \quad E_r = \frac{\sqrt{\pi} S_{max}}{2\sqrt{A}} \quad (2)$$

Tabla 4.11. Valores del módulo elástico y dureza medida por nanoindentación para PHB, PHB-ATP y los bionanocompuestos de PHB-ATP/OMMT con concentraciones de 1 y 5% m/m de arcilla.

Muestra	Dureza (MPa)	Módulo elástico (GPa)
PHB	139,8±14,5	3,14±0,49
PHB-ATP(65:35)	112,6±11,6	2,54±0,49
PHB-ATP/1OMMT	133,7±22,4	2,64±0,38
PHB-ATP/5OMMT	136,2±26,0	3,09±0,71

La dureza se define como la resistencia de un material a ser penetrado o rayado. La tabla 4.11 muestra que los bionanocompuestos presentan un aumento de la dureza de

un 19% para PHB-ATP/1OMMT y 21% para PHB-ATP/5OMMT con respecto a la mezcla PHB-ATP, con respecto al PHB existe una diferencia de un 4 y 2%. El aumento de la dureza en el bionanocompuesto con respecto a la mezcla PHB-ATP se atribuye a las capas de arcilla en el material polimérico, ya que estas oponen resistencia a la penetración.<sup>140</sup>

El módulo elástico de la mezcla PHB-ATP ( 2,54 MPa) es menor que la del PHB (3,14 MPa). Esta disminución es atribuible a que el ATP que está presente en un 35% en masa en la mezcla, es un polímero flexible.<sup>104</sup> El bionanocompuesto PHB-ATP/1OMMT, presenta un aumento del módulo elástico de un 4% y PHB-ATP/5OMMT un aumento del 22% con respecto a la mezcla PHB-ATP, valores que se aproximan al del PHB. El aumento del módulo elástico es por el efecto reforzante que posee la arcilla, ya que mientras más dispersa<sup>141</sup> está en el bionanocompuesto, mayor será el módulo elástico. <sup>140</sup> Esto explicaría que el bionanocompuesto presente un mayor aumento, lo que se corroboró por TEM (figura 4.22) que presentaba una morfología exfoliada.

#### **4.4 Bionanocompuestos con Eugenol**

El eugenol es un componente del aceite esencial obtenido del clavo de olor. Se conocen sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, por lo que se plantea la obtención de bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT con eugenol, para su posible aplicación como material polimérico para envases de alimentos capaz de contrarrestar los procesos de degradación a los que se ven expuestos estos.

##### **4.4.1 Diseño de experimento, definición de parámetros**

La obtención de bionanocompuestos con eugenol contempla un gran número de variables, por lo que se realizó un diseño de experimentos para definir qué variables contribuyen en la obtención de un material polimérico con las mejores propiedades antifúngicas o antioxidantes.

Por lo tanto, se llevó a cabo un diseño de experimentos de tipo factorial completo (FFD) de dos niveles ( $2^3$ ) en que la respuesta analizada fue el contenido de eugenol (%) en la película de bionanocompuesto, se determinó analizar esta respuesta porque será el contenido de eugenol el que otorgue al material polimérico propiedades antifúngicas o antioxidantes. Las variables estudiadas fueron: velocidad de mezclado (60-80 rpm), concentración arcilla (1-3% m/m) y concentración Eugenol (2-3% m/m).



A pesar de que la velocidad de mezclado fue una variable no significativa en los estudios anteriores, fue considerada nuevamente por analizar si tendría algún efecto en la cantidad de eugenol retenido. Con respecto a la concentración de eugenol se descartó la concentración de 1% m/m eugenol ya que, al hacer un análisis preliminar, los bionanocompuestos con 1% m/m eugenol, no presentaron inhibición frente al hongo *Botrytis cinérea* tal como lo muestra la figura 4.28, y se determinó que una concentración mayor a 3% m/m de eugenol alteraba los factores organolépticos de la muestra polimérica.

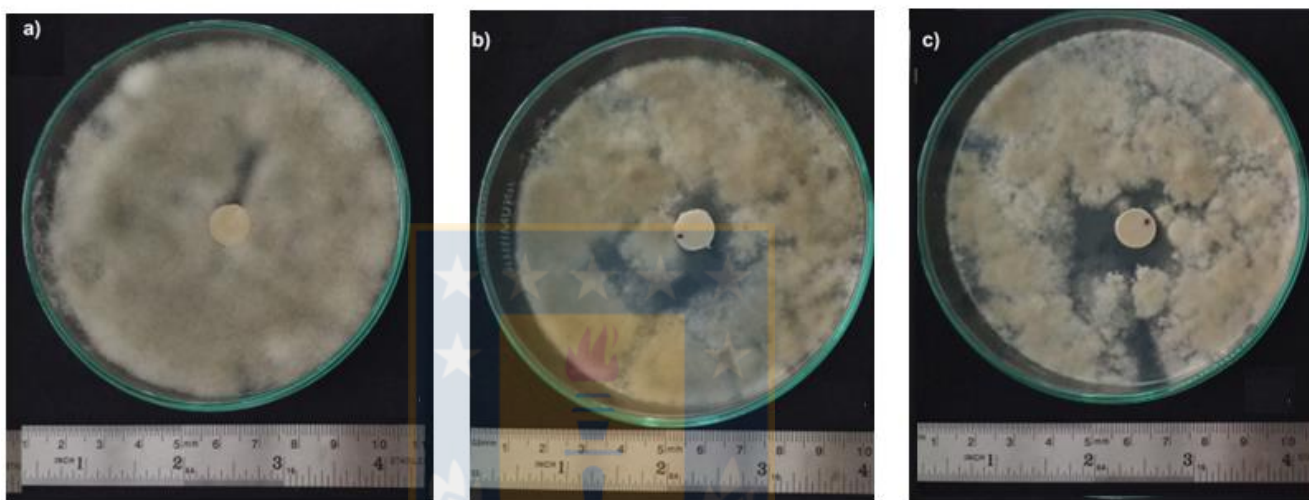


Figura 4.28. Ensayo previo para determinar la concentración mínima de inhibición de eugenol en el bionanocompuesto contra el hongo *Botrytis cinérea*, a) 1% en masa de eugenol, b) 2% en masa de eugenol y c) 3% en masa de eugenol. Fuente: elaboración propia.

El DoE de tipo factorial definió la realización de 11 experimentos en que la respuesta analizada es la concentración de eugenol en la muestra mediante espectroscopia UV-Visible. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Número de experimentos realizados según el diseño de experimentos FFD con su respectiva respuesta de concentración de eugenol para los diferentes Bionanocompuestos.

Run Order	Velocidad de mezclado (rpm)	Eugenol (% m/m)	Arcilla (% m/m)	Cantidad de eugenol retenido (g)
1	60(-1)	2(-1)	1(-1)	0,86
4	80(+1)	2(-1)	1(-1)	0,78

<b>10</b>	60(-1)	3(+1)	1(-1)	1,19
<b>8</b>	80(+1)	3(+1)	1(-1)	1,21
<b>11</b> <b>(Excluida)</b>	60(-1)	2(-1)	3(+1)	0,56
<b>6</b>	80(+1)	2(-1)	3(+1)	0,9
<b>7</b>	60(-1)	3(+1)	3(+1)	1,46
<b>3</b>	80(+1)	3(+1)	3(+1)	1,35
<b>2</b>	70(0)	2,5(0)	2(0)	1,05
<b>9</b>	70(0)	2,5(0)	2(0)	0,97
<b>5</b>	70(0)	2,5(0)	2(0)	1,06

El modelo estadístico evaluado por el test ANOVA y por test falta de ajuste, definió que el modelo de regresión tiene un  $p < 0,000$  (modelo satisfactorio y confiable) y para la falta de ajuste presentó un  $p > 0,05$  ( $p = 0,420$ ), por lo que el modelo no tiene falta de ajuste. El modelo obtenido por regresión lineal múltiple (MLR) se resume en la tabla 4.13.

Tabla 4.13. Parámetros obtenidos para evaluar el modelo obtenido por MLR.

Parámetros del modelo	Valor
$R^2$	0,953
$Q^2$	0,776
Validez del modelo	0,781
Reproducibilidad	0,949

Los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  determinan que el modelo posee una predicción y los valores de validación indican que no existe falta de ajuste. Al estar el modelo estadístico validado por MLR y por el test ANOVA se analizan los coeficientes de regresión obtenidos, que se encuentran representados en la figura 4.29.

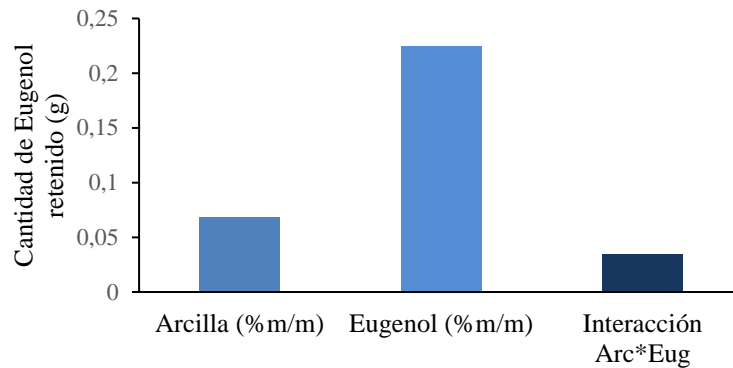


Figura 4.29. Coeficientes del polinomio obtenidos con respecto a la concentración de eugenol en las películas de bionanocompuestos. Fuente: elaboración propia.

En la figura 4.29 muestra solo dos variables de las tres estudiadas. La ausencia de la variable velocidad de mezclado es porque fue descartada al ser no significativa ( $p > 0,05$ ) sobre la cantidad de eugenol retenido en el bionanocompuesto. La variable con el mayor impacto es la concentración de eugenol incorporada. Por otro lado, la concentración de arcilla también influye en la cantidad de eugenol retenido, ya que con una mayor concentración de arcilla hay una mayor incorporación de eugenol, lo que se observa en la tabla 4.13. En la figura 4.29 se muestra que existe una pequeña interacción entre la concentración de arcilla-eugenol. La concentración de arcilla cumple el rol de evitar la rápida liberación del eugenol.<sup>33</sup>

Como ya se definió el efecto de las variables, se puede generar una gráfica del comportamiento del sistema estudiado mediante RSM el que genera los mapas de superficie de respuesta que predicen los valores del módulo elástico tal como la muestra la figura 4.30.

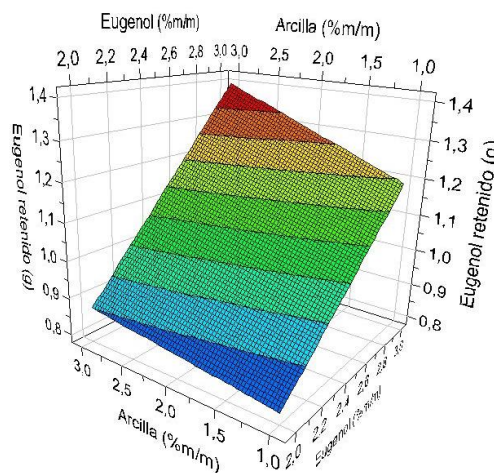


Figura 4.30. Gráficas de contorno obtenidas por RLM, para las variables concentración de eugenol (% m/m) y concentración de arcilla (% m/m). Fuente: elaboración propia.

Las gráficas de contorno muestran cuál es la tendencia del eugenol retenido luego de la obtención de los bionanocompuestos, donde las zonas rojas representan los valores más altos, donde existe una mayor cantidad de eugenol y las zonas azules corresponden a bionanocompuestos con menos contenido de eugenol. La figura 4.30 muestra que a mayor concentración de arcilla y mayor concentración de eugenol hay una mayor retención de eugenol en el bionanocompuesto. Hay que tener presente que la concentración de eugenol siempre disminuirá ya que existe una pérdida de contenido con el proceso de obtención de bionanocompuestos, porque se obtienen a temperaturas cercanas a 160 °C.

#### 4.4.2 Propiedades morfológicas

Se analizó las propiedades morfológicas de los bionanocompuestos con eugenol por DRX, TEM y SEM. Primero se analizaron los difractogramas obtenidos por DRX para determinar la obtención de los diferentes bionanocompuestos. La figura 4.31 muestra que el pico característico de arcilla ( $2\theta = 4,73^\circ$ ) no se visualiza en los diferentes difractogramas de los bionanocompuestos, lo que podría indicar que los materiales obtenidos presentarían una morfología exfoliada, indicando que la presencia de eugenol no afectaría en la inserción de los polímeros entre las capas de arcilla.

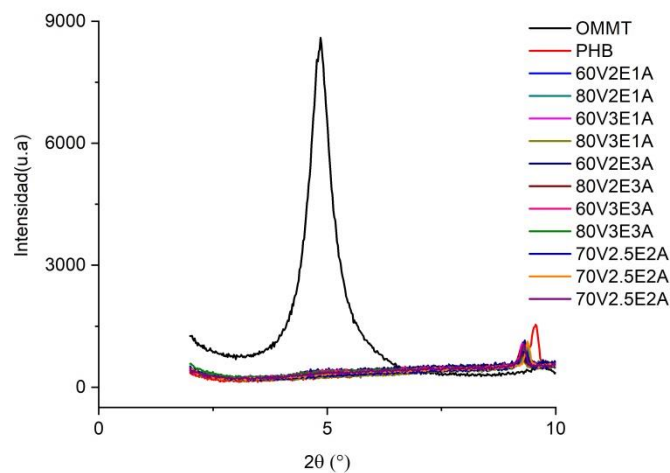


Figura 4.31. Difractogramas de los diferentes bionanocompuestos (velocidad en rpm, concentración en masa de eugenol, concentración en masa de arcilla ej: 60V3E1A) además de la arcilla y el PHB. Fuente: elaboración propia.

Para corroborar la morfología de los bionanocompuestos se realizó TEM, que es una técnica complementaria en la determinación de la morfología. La figura 4.32 a) muestra una mezcla de morfología (tactoide y exfoliada) y la figura b) una morfología intercalada en el bionanocompuesto 60V2E3A. Para el bionanocompuesto 70V2,5E2A (figura 4.32 c) y d), muestra que las láminas de arcilla tienen un orden paralelo lo que indica una morfología intercalada. Finalmente, en el bionanocompuesto 60V3E1A, predomina una morfología exfoliada ya que en las figuras e) y f) se muestran las capas de arcilla dispersadas totalmente. Se observa que un mayor contenido de arcilla en el bionanocompuesto dificulta su dispersión y por lo tanto la inserción del polímero entre sus capas, ya que predominan las aglomeraciones de la arcilla.<sup>142</sup> Por otra parte, una menor cantidad de arcilla y una mayor concentración de eugenol facilitan que los polímeros se intercalen en las capas de arcilla de tal forma de dispersarlas totalmente.



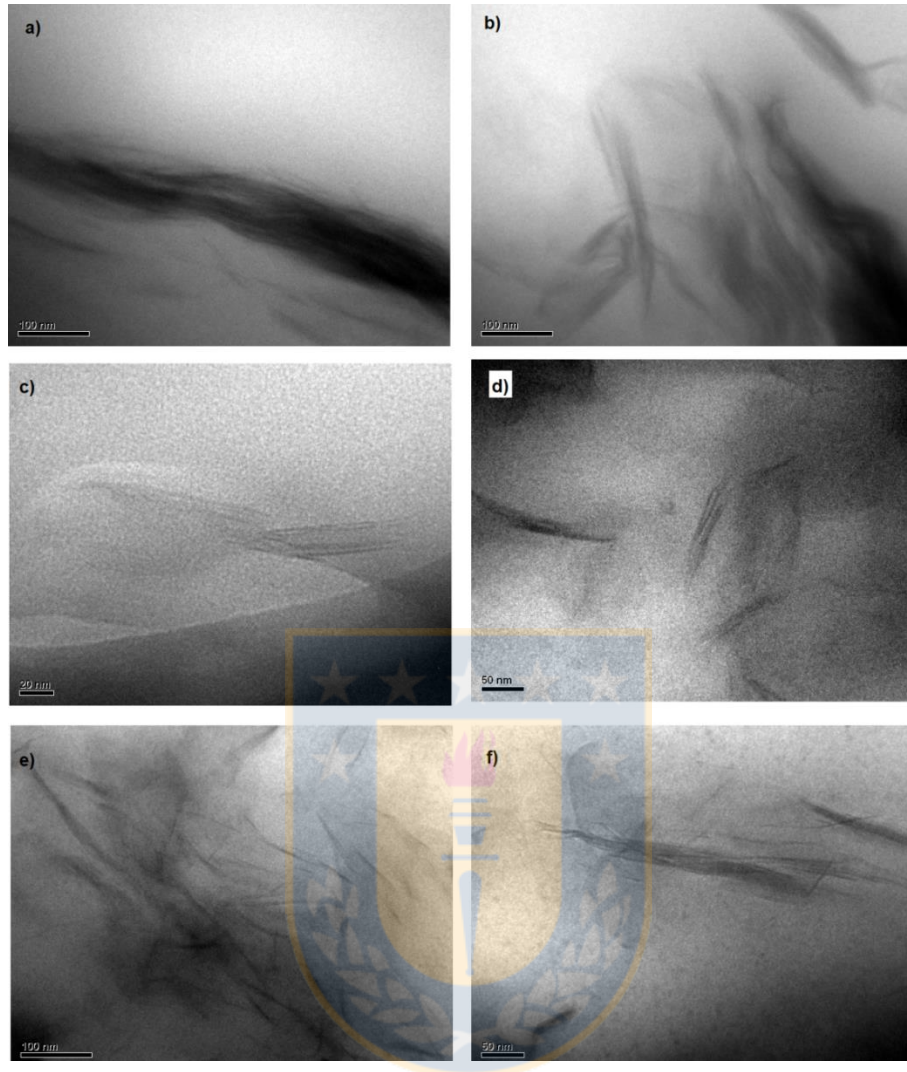


Figura 4.32. Microfotografías TEM para a)-b) bionanocompuesto 60V2E3A, c)-d) bionanocompuesto 70V2,5E2A, y e)- f) es el bionanocompuesto 60V3E1A. Fuente: elaboración propia.

De las tres técnicas utilizadas en análisis morfológico SEM entrega información de cómo se encuentra el almidón en los bionanocompuestos y de la superficie del material polimérico. Se tomaron microfotografías SEM de la cara superior de las películas y del corte transversal, las cuales se muestran en la figura 4.33.

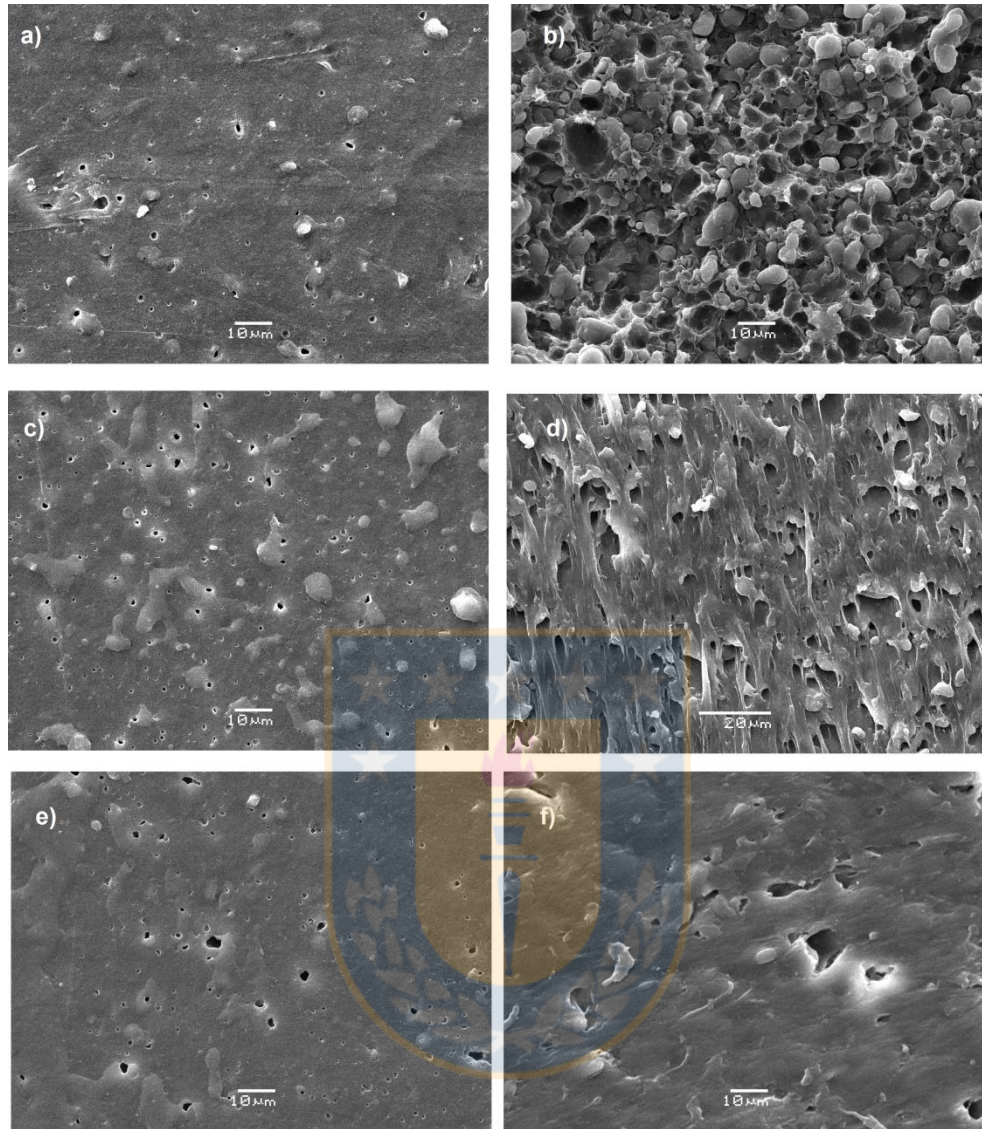


Figura 4.33. Microfotografías SEM para a)-b) bionanocompuesto 60V2E3A, c)-d) bionanocompuesto 70V2,5E2A, y e)- f) es el bionanocompuesto 60V3E1A. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.33 muestra que la superficie de los bionanocompuestos con eugenol presentan una escasa presencia de gránulos de almidón. En la figura a) se observa que hay una mayor cantidad de gránulos a diferencia de la figura c) en que solo se observa uno de gran tamaño. Cuando se observa el corte transversal hay diferencias significativas entre los diferentes bionanocompuestos, aquel con mayor concentración de arcilla y menor concentración de eugenol muestra claramente los gránulos de almidón, lo que es atribuido a la poca afinidad PHB-ATP. A medida que se va aumentando la concentración de eugenol y disminuyendo la concentración de arcilla,

se observa que los gránulos de almidón ya no se ven claramente. Esto podría ser atribuido a que el eugenol permitiría una mejor interacción entre los polímeros y el almidón, pero también se debe considerar que la arcilla se encuentra mejor dispersada a bajas concentraciones (figura 4.32, TEM) por lo que su rol como compatibilizante entre polímeros inmiscibles podría ser el que también mejora la interacción entre los polímeros, tal como lo han demostrado algunas investigaciones.<sup>130,131,82,143</sup>

#### 4.4.3 Propiedades térmicas

Se determinaron las propiedades térmicas de los bionanocompuestos con eugenol mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétricos (TGA). La figura 4.34 muestra los termogramas de los diferentes bionanocompuestos con eugenol y los parámetros obtenidos por DCS se encuentran resumidos en la tabla 4.15. Las termogramas fueron organizados según el contenido de eugenol ya que se observó que los bionanocompuestos con 2%, 2,5% y 3% de Eugenol presentan curvas diferentes cuando se analiza la aparición de la segunda temperatura de fusión ( $T_f^2$ ), ya que las termogramas de la figura a) no muestra un pico definido para  $T_f^2$ , el cual si se observa en la figura b) y c).

La presencia de un segundo pico de fusión se atribuye al proceso de fusión-recristalización-fusión, ya que la fusión de los cristalitas primarios formados durante el barrido de enfriamiento y la fusión de los cristalitas recristalizados que se formaron durante el proceso de calentamiento son los que llevan a la obtención de  $T_f^1$  y  $T_f^2$ .<sup>144</sup> Que el segundo pico endotérmico sea más pronunciado para 2,5 y 3% m/m de eugenol, se debe a que la concentración de eugenol afectaría el proceso de recristalización del PHB, aumentando o disminuyendo la cantidad de cristales imperfectos.

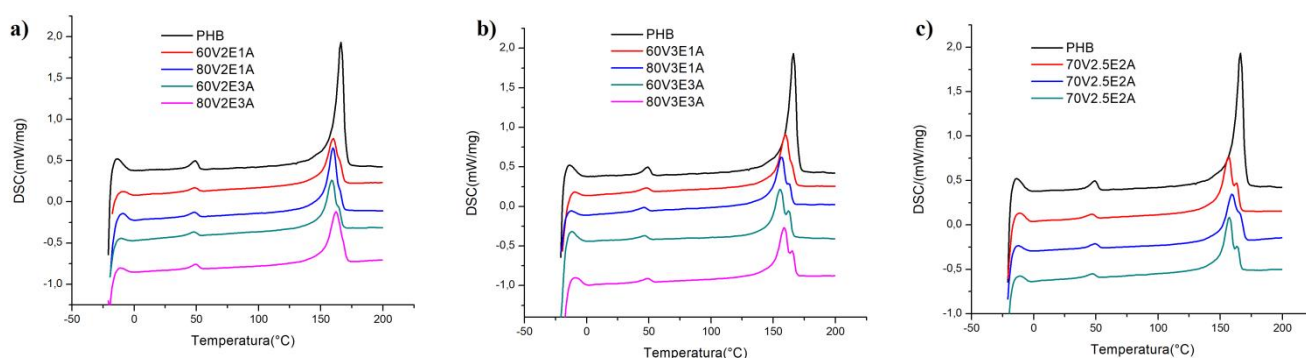


Figura 4.34. Termogramas del segundo calentamiento para PHB y los bionanocompuesto con diferente velocidad obtenida, concentración eugenol y concentración de arcilla. Fuente: elaboración propia.



La tabla 4.15 muestra las temperaturas de fusión ( $T_f$ ) de los diferentes bionanocompuestos. Al comparar las  $T_f$  de los bionanocompuestos 80V3E1A y 60V3E3A con la del PHB, estas disminuyen en  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Esto puede estar relacionado con una menor perfección de los cristales que se forman como resultado que la arcilla restringe el movimiento de las cadenas de PHB.<sup>145</sup>

Con respecto al grado de cristalinidad de los bionanocompuestos con eugenol, se observa que hay una influencia de la velocidad de mezclado y eugenol, ya que para una velocidad de 60 rpm y 1% en masa de arcilla, la cristalinidad varía de 47% a 54%, para concentraciones de 2 y 3% m/m de eugenol, lo que podría atribuirse a un efecto nucleante del eugenol. Pero si se aumenta la velocidad de mezclado a 80 rpm y 1% m/m de arcilla, la cristalinidad disminuye de 56,9% a 50,3% para concentraciones de 2 y 3% m/m de eugenol. Por lo que menores velocidades y mayores concentraciones de eugenol, mayor cristalinidad.

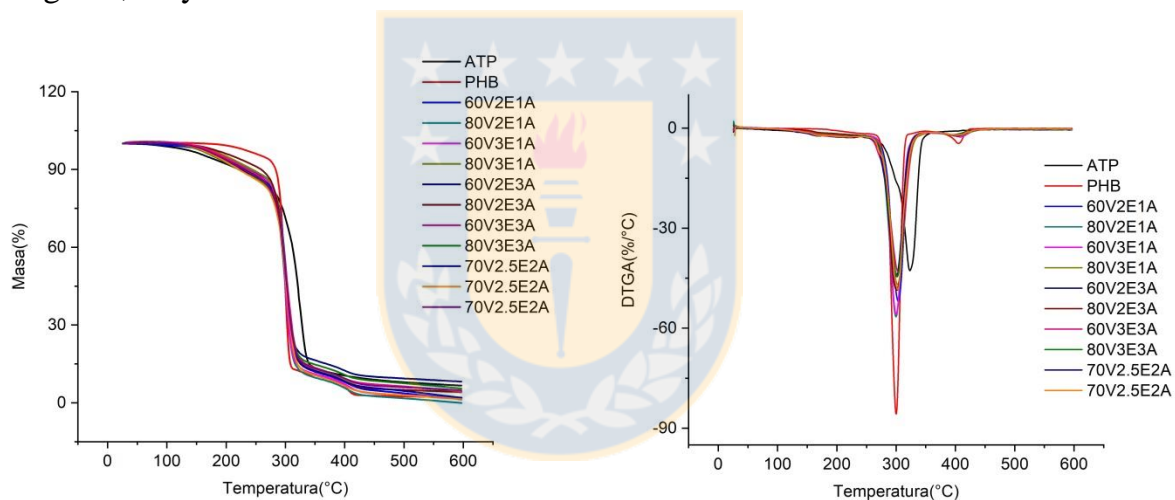


Figura 4.35. Perfil de descomposición térmica para PHB, ATP y los bionanocompuestos con diferente velocidad obtenida, concentración eugenol y concentración de arcilla. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.35 presenta la estabilidad térmica de PHB, ATP y los diferentes bionanocompuesto con el aceite esencial (eugenol). La figura 4.35 a) muestra que los bionanocompuestos presentan tres etapas de descomposición. La primera etapa ( $100\text{--}180\text{ }^\circ\text{C}$ ) corresponde a la pérdida de agua asociada a la presencia de ATP, la segunda etapa ( $\sim 300\text{ }^\circ\text{C}$ ) de descomposición corresponde a la degradación de la mezcla PHB-ATP. La tercera etapa ( $\sim 400\text{ }^\circ\text{C}$ ) de descomposición se atribuye al plastificante que posee el PHB comercial.<sup>91</sup> El pico correspondiente a la temperatura de descomposición (segunda etapa) de los diferentes bionanocompuestos con eugenol es

similar al PHB. La temperatura de descomposición del ATP es 323,3 °C y para los bionanocompuestos se encuentra aproximadamente a 300 °C, tal como lo muestra la tabla 4.14.

Tabla 4.14. Resultados obtenidos por DSC y TGA para PHB, ATP y los diferentes bionanocompuestos con eugenol.

Muestra	Tf <sub>1</sub> (°C)	Tf <sub>2</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	Grado de cristali nidad (%)	T <sub>d</sub> (°C)	T <sub>5%</sub> (°C)	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>50%</sub> (°C)
60V2E1A	160,2		103,1	43,32	34,26	47,1	303,4	193,6	238,6	301,6
80V2E1A	160,0		105,3	52,42	42,25	56,9	299,8	196,0	242,0	298,0
60V3E1A	159,8	164,9	104,3	48,84	40,77	53,6	299,9	192,6	233,6	298,6
80V3E1A	156,7	162,8	102,6	45,83	38,15	50,3	302,4	200,7	243,7	300,7
60V2E3A	159,1		104,3	43,14	38,22	47,9	299,7	190,7	232,7	298,7
80V2E3A	162,4		106,7	47,96	43,33	53,2	300,6	212,5	258,5	299,5
60V3E3A	155,6	162,8	102,8	49,11	42,48	55,1	303,3	194,8	235,8	300,8
80V3E3A	162,8	165,6	103,8	38,45	34,04	43,1	301,7	178,7	220,7	299,7
70V2,5E2 A	156,6	163,5	103,0	46,53	39,94	51,3	301,5	185,9	226,9	298,9
70V2,5E2 A	159,6	165,8	104,6	45,75	37,39	50,5	302,3	181,7	220,7	299,7
70V2,5E2 A	157,2	163,6	103,8	41,78	38,05	46,1	302,9	187,8	228,8	299,8
PHB		166,1	112,1	81,92	70,49	56,1	299,9	262,2	282,2	298,2
ATP							323,3	166,7	221,7	318,7

La tabla 4.14 muestra las temperaturas cuando se ha perdido un 5% (T<sub>5%</sub>) y un 10% (T<sub>10%</sub>) en masa. Al analizar estos parámetros se observa la influencia del almidón en los bionanocompuestos, ya que (T<sub>5%</sub>) y la (T<sub>10%</sub>) son mucho menores con respecto al PHB. Esta disminución es atribuida a la pérdida de agua presente en el almidón. La temperatura para T<sub>5%</sub> va a depender si el agua está libre, levemente unida o unida al polímero.<sup>135</sup> Para las variaciones de T<sub>10%</sub> se debe considerar la influencia de la evaporación del glicerol (utilizado para plastificar el almidón) que se produce aproximadamente a 180 °C, las cuales podrían producir las diferencias de las temperaturas obtenidas.

T<sub>5%</sub> y T<sub>10%</sub> de los bionanocompuesto son mayores que los del ATP, lo que podría ser atribuido a que la arcilla dificultaría la rápida liberación de agua y de glicerol.<sup>146</sup>

## 4.5 Bionanocompuestos con propiedad antimicrobiana, antioxidante y biodegradable

Se definió la concentración de eugenol en 2,5% y 3% m/m, con una concentración de arcilla de 3% m/m en el bionanocompuesto, así se obtendrán materiales poliméricos con propiedades antioxidantes y antifúngicas las cuales permitirán obtener un material polimérico para su posible aplicación en la industria de los envases de alimentos.

Para corroborar que las propiedades (antioxidante y antifúngica) del eugenol permanecen con la obtención bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT/Eugenol, se realizaron ensayos de capacidad antioxidante por DPPH, antifúngico contra *botrytis cinérea* además de análisis térmicos, morfológicos, mecánicos y de degradación a los diferentes bionanocompuestos.

### 4.5.1 Análisis Morfológico

La morfología de los bionanocompuestos fue determinada por DRX y TEM. La figura 4.36 muestra los difractogramas de la arcilla (con un pico característico a  $4,81^\circ$ ), PHB, de la mezcla PHB-ATP y de los bionanocompuestos con y sin eugenol. Para el PHB y mezcla PHB-ATP no se observan picos en el rango de  $2$  a  $6^\circ$ , ya que los picos característicos del PHB y del ATP aparecen a ángulos más altos. El pico que se encuentra aproximadamente a  $9^\circ$  corresponde a la señal de trazas de material inorgánico (talco)<sup>91</sup> que posee el PHB comercial.

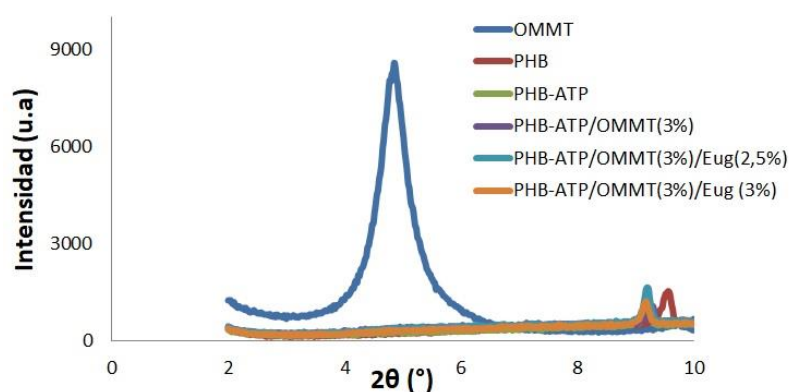


Figura 4.36. Difractograma para la arcilla (OMMT) (—), PHB (—), mezcla PHB-ATP (—), bionanocompuesto (—) y los bionanocompuestos con 2,5% (—) y 3% (—) en masa de eugenol. Fuente: elaboración propia.

En los difractogramas de los bionanocompuestos con y sin eugenol, no se observa el pico característico de la arcilla, lo que podría indicar que los bionanocompuestos presentan una morfología exfoliada, como consecuencia de la buena interacción entre los polímeros y las capas de arcilla. Esta interacción permitiría que la matriz polimérica se incorpore entre las capas de arcilla separándolas totalmente.<sup>147</sup>

La mayoría de los nanocompuestos presenta más de un tipo de morfología: intercalada-exfoliada o intercalada-tactoide, por esta razón se utiliza como técnica complementaria TEM, para corroborar los resultados de DRX.

La distribución de las capas de arcilla en el material polimérico se observó en las microfotografías TEM. La figura 4.37 muestra en todos los casos una morfología intercalada, las que se observan en la figura 4.37 a), c) y d). En los tres casos las láminas de arcillas se encuentran separadas, pero mantienen un orden paralelo entre ellas. Por otra parte, algunas zonas de las microfotografías d) y f) se observan láminas de arcilla aisladas que podrían indicar que también se presenta una morfología exfoliada en los bionanocompuestos.

Los resultados indican que la presencia de eugenol en el bionanocompuesto no altera la buena distribución de la arcilla en el material polimérico. Una morfología exfoliada aumenta el efecto de tortuosidad<sup>55,148</sup> lo que permite retrasar la difusión del aceite esencial<sup>32,55,149,33</sup> (eugenol) hacia el exterior, ya que las capas de arcilla son impermeables por lo que el aceite esencial debe recorrer un camino más largo.<sup>34</sup>

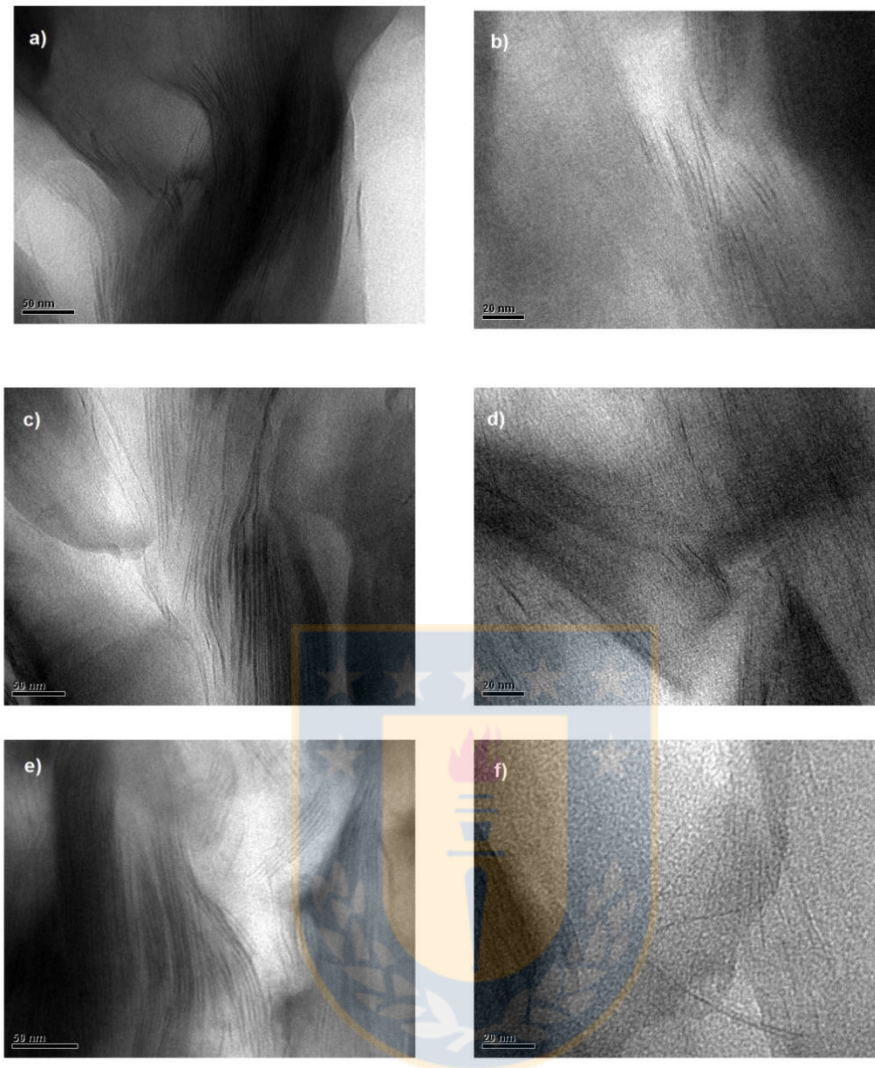


Figura 4.37. Microfotografías TEM para b) PHB-ATP/OMMT (3%) c) y d) PHB-ATP/OMMT (3%) / Eug (2,5%), e) y f) PHB-ATP/OMMT (3%) / Eug (3%). Fuente: elaboración propia.

Mediante SEM se analizó el efecto del eugenol en la superficie de los bionanocompuestos. La figura 4.38 muestra como en ausencia del eugenol se ven claramente los gránulos de almidón, pero cuando el bionanocompuesto posee eugenol, ya no se observa claramente, lo que es indicativo que el eugenol mejora la interacción entre PHB-ATP, debido a las posibles interacciones intermoleculares entre eugenol-polihidroxibutirato, eugenol-almidón, ya que posee grupos hidroxilos disponibles. Una mejor dispersión de la arcilla mejora la adhesión interfacial entre polímeros inmiscibles ya que se ha determinado su capacidad como agente compatibilizante y reforzante. <sup>130,131,82,143</sup>

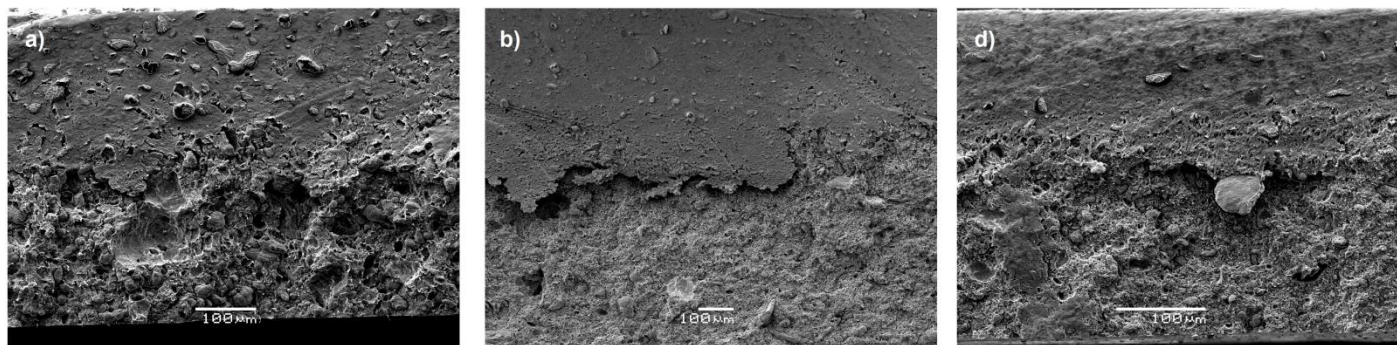


Figura 4.38. Imágenes SEM del corte transversal para a) PHB-ATP/OMMT (3%) b) PHB-ATP/OMMT (3%) / Eug (2,5%) y c) PHB-ATP/OMMT (3%) / Eug (3%). Fuente: elaboración propia.

#### 4.5.2 Análisis topográfico

La microscopía de fuerza atómica es una técnica para analizar la superficie de los materiales poliméricos, en la cual se obtienen imágenes topográficas bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D). Las imágenes obtenidas para el PHB, la mezcla PHB-ATP y de los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT (3%), PHB-ATP/OMMT (3%) / Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT (3%) / Eug (3%). La figura 4.39 a) corresponde al PHB, esta presenta una superficie relativamente lisa y una altura máxima de 180,3 nm. La mezcla PHB-ATP presenta una altura de 315,8 nm, lo que indicaría la presencia de algún desorden en las superficies de la película polimérica.<sup>150</sup> El desorden podría ser atribuido a la presencia de los gránulos de almidón o la escasa homogeneidad entre los polímeros.<sup>150</sup>

En los bionanocompuestos el desorden en la superficie se encuentra asociado a la presencia de arcilla, ya que se ha determinado que cuando no existe una buena interacción polímero-arcilla, la arcilla tiende a migrar hacia la superficie, lo que aumenta la rugosidad<sup>151</sup> produciendo un aumento en la altura.

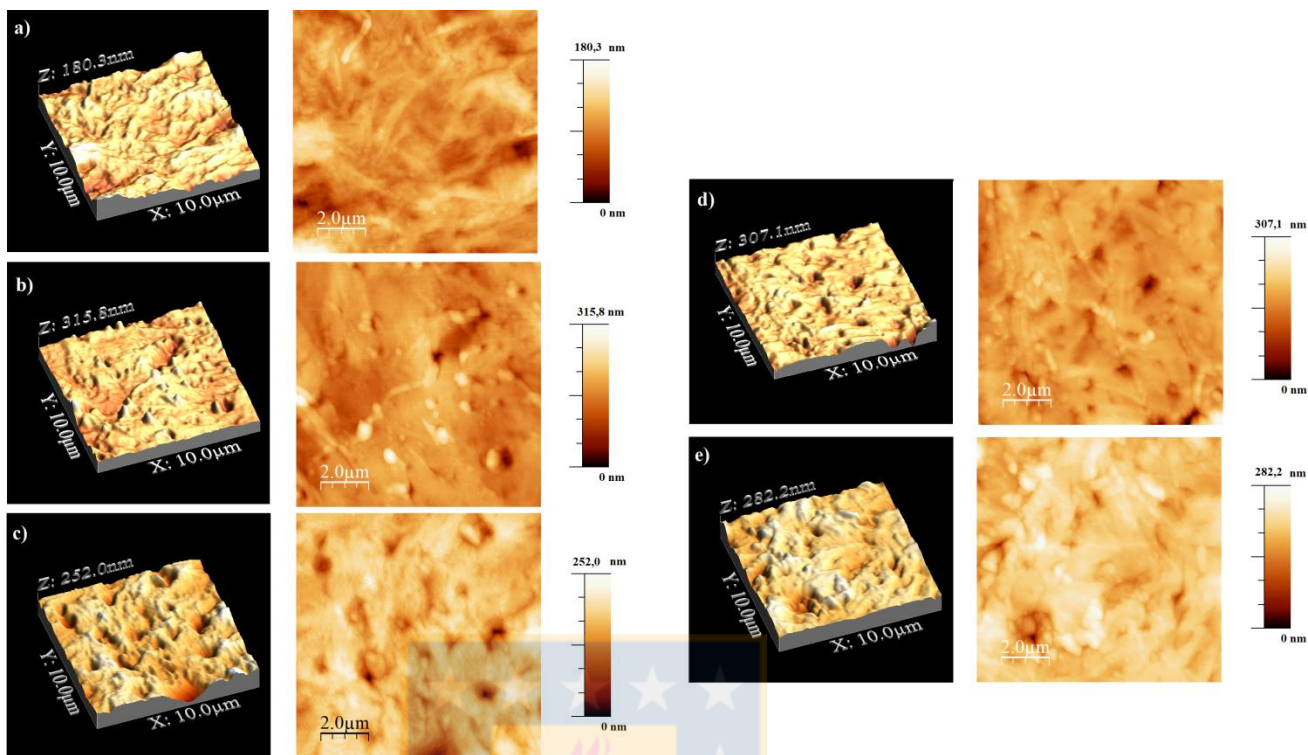


Figura 4.39. Imágenes topográficas 3D y 2D obtenidas por AFM para a) PHB, b) PHB-ATP, C) PHB-ATP/OMMT(3%), d) PHB-ATP/OMMT(3%)/Eug (2,5%) y e) PHB-ATP/OMMT(3%)/Eug (3%). Fuente: elaboración propia.

Los valores de rugosidad superficial media ( $R_a$ ) y rugosidad cuadrática media (RMS) se muestran en la Tabla 4.15. El PHB presenta una rugosidad superficial de  $13,0 \pm 5,3$  nm, la mezcla PHB-ATP de  $18,9 \pm 2,9$  nm y los bionanocompuestos de  $21,6 \pm 2,4$  nm, respectivamente. La rugosidad de los bionanocompuestos está asociada a la influencia de la arcilla. Esta migra hacia la superficie del material polimérico como consecuencia de interacciones débiles con los polímeros o a la mala dispersión de la arcilla, lo que podría producir aglomeraciones de arcilla en las zonas superficiales.<sup>132,133</sup>

La presencia de eugenol en los bionanocompuestos no afecta la rugosidad (solo un aumento de 5%), lo que sería atribuido a que se encuentra retenido en el interior del material polimérico.

Tabla 4.15. Rugosidad superficial y Rugosidad cuadrática media para PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT y PHB-ATP/OMMT/Eug.

Muestra	Rugosidad superficial promedio (Ra) (nm)	Rugosidad cuadrática media (RMS) (nm)
PHB	13,0±5,3	20,4±6,1
PHB-ATP	18,9±2,9	24,6±4,1
PHB-ATP/OMMT (3%)	21,6±2,4	29,1±2,8
PHB-ATP/OMMT (3%) /Eug (2,5%)	20,8±3,4	28,9±4,9
PHB-ATP/OMMT (3%) /Eug (3%)	22,8±7,7	32,5±14,2

#### 4.5.3 Propiedades mecánicas

Se determinó el módulo de tensión (ASTM 638) para PHB, PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT (3%) y PHB-ATP/OMMT (3%)/Eugenol (2,5 y 3% m/m). La tabla 4.16 muestra que el módulo elástico de la mezcla PHB-ATP disminuyó un 25% (1175 MPa) con respecto al PHB (1570 MPa), esta disminución se asocia a que el ATP (109 MPa) es polímero mucho más flexible que el PHB y a la baja compatibilidad entre los polímeros.<sup>91,152</sup>

El módulo elástico de los bionanocompuestos (1760 MPa) aumenta con respecto a la de mezcla PHB-ATP. Este aumento es atribuido a que la arcilla OMMT posee un efecto reforzante,<sup>153</sup> que produce que las cadenas de polímeros limiten sus movimiento de tal forma que aumenta la rigidez del material.<sup>49</sup>

Tabla 4.16. Propiedades mecánicas módulo elástico, resistencia a la tracción y a alargamiento a la rotura para ATP, PHB y los bionanocompuestos.

Muestra	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Alargamiento a la rotura (%)
ATP	109±25	3,4±0,4	11,9 ±2,9
PHB	1560±283	24,2±1,5	3,65 ±0,21
PHB-ATP (65:35)	1175 ±120	13,2±2,8	1,50±0,28
PHB-ATP/OMMT (3%)	1760±113	14,8±1,1	1,10 ±0,01



PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%)	1645±78	16,3±0,5	1,35 ±0,07
PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%)	1565±64	16,8±0,2	1,45 ±0,07

La resistencia a la tracción de la mezcla PHB-ATP presenta una disminución de un 45% y los bionanocompuestos de un 40% con respecto a la del PHB. Por lo tanto, los materiales poliméricos son menos resistente que el PHB. La disminución de la resistencia a la tracción en la mezcla y los bionanocompuesto fue descrito por Reis et al, como una consecuencia de la baja capacidad que tendrían los gránulos de almidón para alargarse<sup>123</sup> esto explicaría que el ATP presente un valor 3,4 MPa.

Por otro lado algunos autores como Thiré y Godbole han asociado la disminución de la resistencia a la tracción a una baja o mala adhesión interfacial entre el PHB y el ATP,<sup>104,123</sup> lo que explicaría que el alargamiento a la rotura de la mezcla PHB-ATP y de los diferentes bionanocompuestos sea menor al del PHB en un 60% y en un 70% respectivamente, y con respecto al del ATP la diferencia es de un 80%.

### Nanoindentación

Las propiedades mecánicas superficiales de un material polimérico tales como módulo elástico y dureza (representa la resistencia del material a la penetración y al rayado) fueron estudiadas por nanoindentación. La figura 4.40 muestra las diferentes indentaciones realizadas en una muestra de PHB, con una matriz de 5x5 (25 indentaciones).

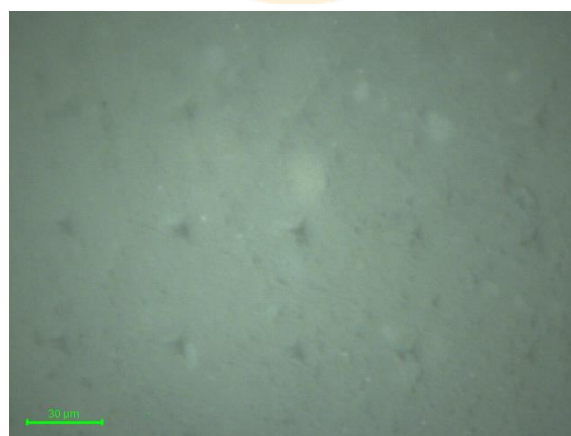


Figura 4.40. Matriz de nanoindentaciones realizadas en PHB. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.41 muestra las curvas de carga-descarga para PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos con diferentes concentraciones de eugenol (carga aplicada 12400 mN). En esta figura se pueden observar el desplazamiento (penetración del indentador) de la mezcla y de los bionanocompuesto aumenta en comparación con la del PHB. El desplazamiento se relaciona directamente con el área de contacto para un indentador definido. De acuerdo con la ecuación 3 la dureza es inversamente proporcional al área bajo la curva carga-desplazamiento.

$$D = \frac{P_{max}}{A} \quad (3)$$

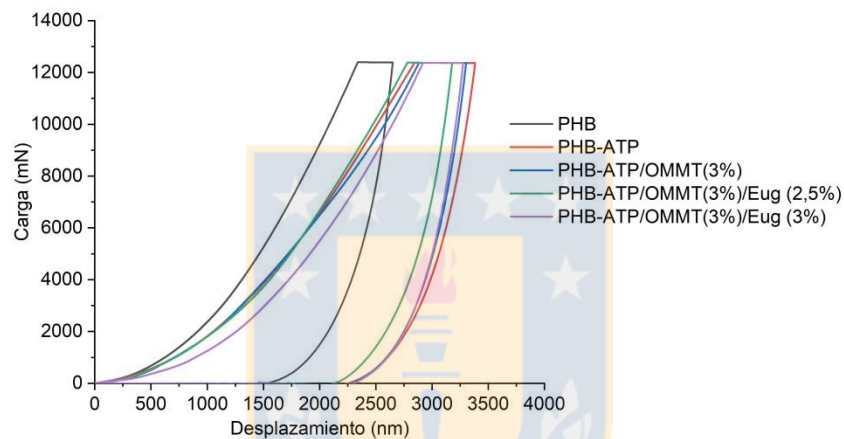


Figura 4.41. Curvas de indentaciones carga-desplazamiento para PHB, mezcla y bionanocompuesto con eugenol y sin eugenol. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.42 a) muestra una dureza de 92,6 MPa para el PHB (desplazamiento máximo de 2647 nm) y de 53,7 MPa para PHB-ATP (desplazamiento máximo de 3382 nm), lo que indica que opone menos resistencia a la penetración. La diferencia de dureza entre la mezcla PHB-ATP y PHB se atribuye a la presencia de almidón en la mezcla, ya que es un material polimérico más blando que el PHB. <sup>104</sup> Los bionanocompuestos presentaron un leve aumento de la dureza con respecto a la mezcla PHB-ATP, pero no hay cambios significativos con la presencia del eugenol.

El módulo elástico obtenido por nanoindentación muestra valores de: 2,26 GPa para el PHB, de 1,46 GPa para la mezcla PHB-ATP. Los bionanocompuestos presentaron un aumento del 10% del módulo elástico con respecto a la mezcla PHB-ATP y disminuyó un 28% con respecto al PHB, por lo tanto, se aumenta la rigidez del material al incorporar la arcilla. La disminución del módulo elástico es atribuible a

presencia de ATP, tal como fue determinado cuando se analizó el módulo elástico obtenido por ensayo de tensión.

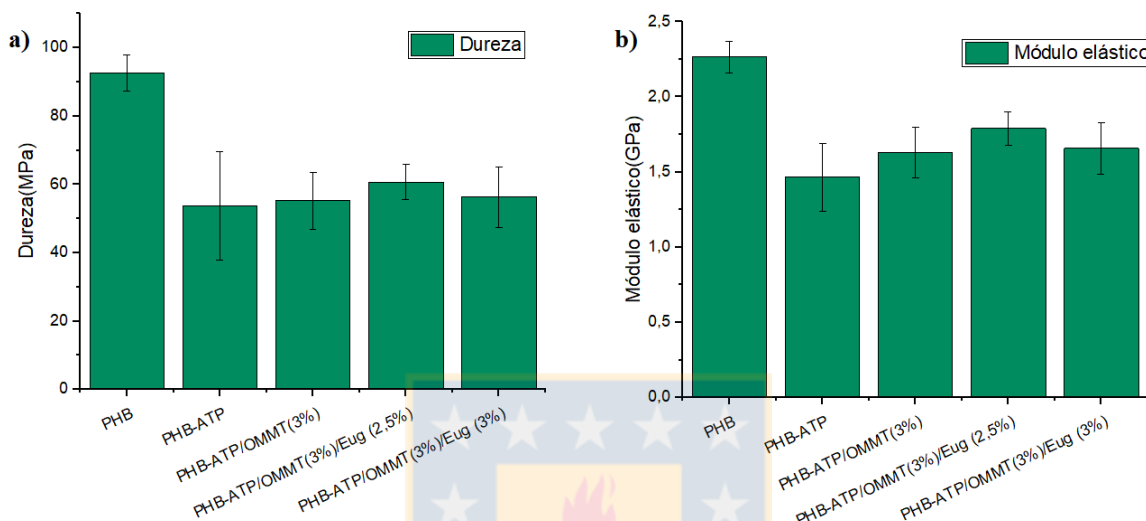


Figura 4.42. a) Dureza para PHB, la mezcla PHB-ATP y los diferentes bionanocompuestos y b) módulo elástico obtenido por nanoindentación para PHB, la mezcla PHB-ATP y los diferentes bionanocompuestos. Fuente: elaboración propia.

La diferencia entre el módulo elástico de los bionanocompuestos y la mezcla PHB-ATP es muy pequeña. Esta leve diferencia se atribuiría a que la zona analizada por nanoindentación es más representativa de la mezcla que del bionanocompuesto, lo que es atribuido a una baja dispersión de la arcilla. <sup>154</sup>

### **Análisis Térmico Dinamo-Mecánico (DMTA)**

Las propiedades mecánicas de un plástico se ven fuertemente influenciadas por la temperatura, que influye en una disminución de la rigidez del material y un incremento de su flujo viscoso. Estas variaciones se ven reflejadas en el módulo de almacenamiento ( $E'$ ), módulo de pérdida ( $E''$ ) y factor de pérdida ( $\tan \delta$ ). Estos factores se determinaron mediante Análisis Dinámico Mecánico Térmico (DMTA). Cuando se analiza el factor de pérdida ( $\tan \delta$ ) se observan transiciones secundarias como la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), así el DMTA es una técnica más sensible que el DSC.

Para el análisis DMTA de todas las muestras se utilizó un rango de temperatura de -140° a 100 °C, una velocidad de barrido 2,00 °C/min, una amplitud de deformación de 0,1% y frecuencia de 10 Hz para PHB, la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos.

En la figura 4.43 se observa que a bajas temperaturas el ATP (-100 °C) se comporta como un polímero rígido con un E' de aproximadamente 16000 MPa a diferencia del PHB con un E' de 4000 MPa. Considerando que el módulo de almacenamiento refleja la capacidad de un material para almacenar energía mecánica sin disipación y resistir la deformación, el ATP a temperaturas menores a -70 °C es más resistente a la deformación por lo tanto es más rígido que la mezcla y los bionanocompuestos. Pero luego tiene una caída pronunciada aproximadamente a -50 °C y comienza a comportarse como un polímero con una baja resistencia a la deformación o sea más flexible. Por otro lado, el PHB muestra una disminución suave del módulo con la temperatura.

En la mezcla PHB-ATP el valor de E' (7740 MPa) es consistente con la relación PHB-ATP (65:35) que contiene la mezcla. Los bionanocompuestos muestran un E' de 7432 MPa mayor que el del PHB. Este aumento es atribuible a la alta rigidez y relación de aspecto del nanorelleno. Además de la buena afinidad a través de la interacción interfacial entre los polímeros y la arcilla dispersada.<sup>51</sup>

De los diferentes bionanocompuestos, el PHB-ATP/OMMT(3%) presentó el mayor E' en todo el rango de temperatura hasta aproximadamente 50 °C. Sobre 50 °C no hay una diferencia significativa entre los E', lo que indicaría que la cantidad de ATP, arcilla y eugenol no influyen en la capacidad de disipar energía del PHB a partir de esa temperatura.

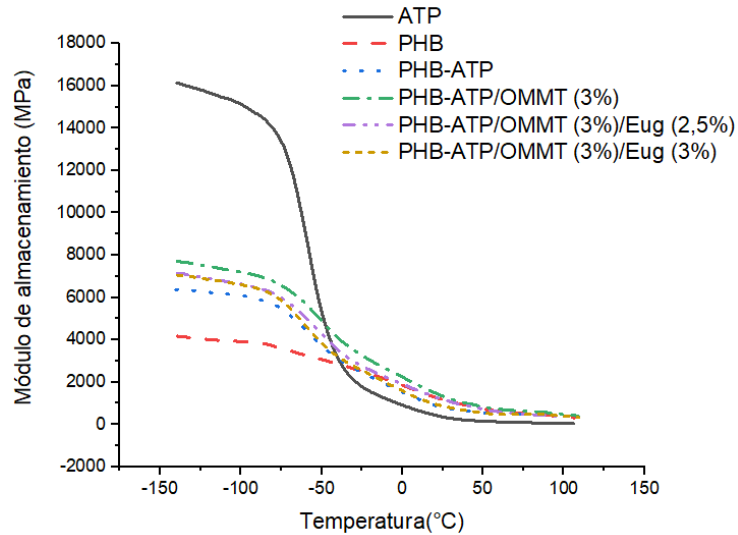


Figura 4.43. Variación del módulo de almacenamiento con la temperatura. Fuente: elaboración propia.

Otro parámetro que se puede determinar es el módulo de pérdida que refleja la capacidad de los materiales para disipar energía. La figura 4.44 muestra las transiciones relacionadas con la región amorfa de los polímeros (transición secundaria). En esta zona se activan los movimientos moleculares, aunque ocurren con dificultad, lo que produce fricción molecular disipando gran parte del esfuerzo como calor, lo que conlleva a un aumento del módulo de pérdida.

El módulo de pérdida del ATP es de 1714 MPa, lo que indica que posee una gran capacidad de disipación. Además este pico (figura 4.44) es atribuido a la relajación  $\beta_1$  del almidón plastificado y se origina a partir de la miscibilidad parcial de glicerol y almidón, específicamente la relajación  $\beta_1$  que corresponde a la fase rica en glicerol (glicerol puro tiene una transición de  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).<sup>155</sup> Para la mezcla PHB-ATP y el bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) la transición atribuida al almidón sigue apareciendo a  $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pero con una disminución del módulo de pérdida de 410 MPa para el PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) y de 592 MPa para la mezcla.

La disminución en la intensidad de la transición PHB-ATP, se atribuye a la contribución del PHB en la mezcla, ya que el PHB posee un menor módulo de pérdida (disipa menos energía). Comparado con el ATP que tiene un mayor módulo (disipa más energía). Para el PHB-ATP/OMMT(3%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) de eugenol, la transición se desplazó a temperaturas más altas ( $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ya que se restringe el movimiento del glicerol producido por las interacciones moleculares entre el ATP-PHB y ATP-Arcilla.

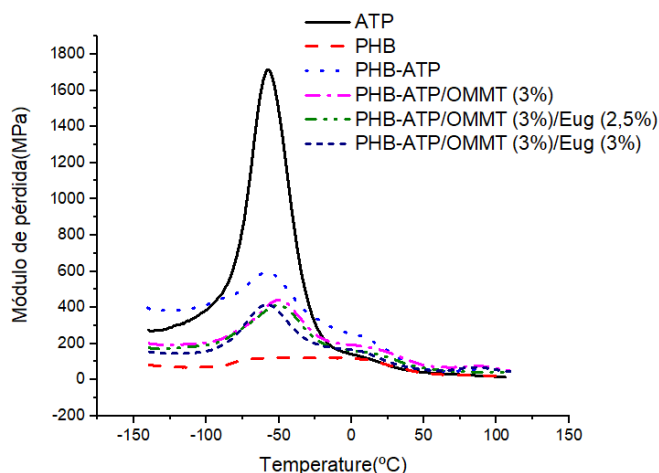


Figura 4.44. Variación del módulo de pérdida con la temperatura. Fuente: elaboración propia.

Tan delta (factor de amortiguación) proporciona información sobre la energía pérdida en un sistema debido a la deformación y está relacionada con la resistencia al impacto de un material polimérico. La figura 4.45 muestra que la intensidad máxima del ATP se relaciona con la relajación  $\beta_1$  (45 °C). Para PHB-ATP y los bionanocompuestos se observa una disminución de la intensidad la que estaría asociada a que el PHB-arcilla-eugenol reducen la movilidad de las cadenas de almidón. Esto además sugiere que cuando se elimina el estrés. La energía almacenada en la deformación del material se recupera más rápidamente<sup>156</sup> en comparación a la del ATP. También se observa que  $\beta_1$  de la mezcla y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) se desplaza a temperaturas más bajas, aproximadamente a -50 °C lo que indicaría que el movimiento molecular asociado a la fase rica en glicerol del ATP se encuentra levemente restringido. Para el PHB-ATP/OMMT(3%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) no hay variación (-44 °C).

El PHB muestra una relajación a 16 °C correspondiente a la temperatura de transición vítrea (Tg). Para PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) la Tg se desplazó a temperaturas más altas, 20 °C, 28 °C y 25 °C, 15 °C respectivamente. El aumento de la Tg sugiere que se restringe la movilidad de las cadenas debido a una dispersión homogénea de la arcilla, además de las interacciones entre carga (arcilla o eugenol) y la matriz polimérica, lo que dificulta el movimiento de las cadenas lo cual aumenta la Tg.<sup>139</sup> Por otra parte se observó en la figura 4.45 que la Tg de los materiales poliméricos disminuye con la concentración de eugenol. Finalmente el PHB-ATP/OMMT(3%)

tiene la mayor  $T_g$ , por lo tanto es capaz de disipar mejor la energía lo que se define en una mejor resistencia al impacto a temperatura ambiente.

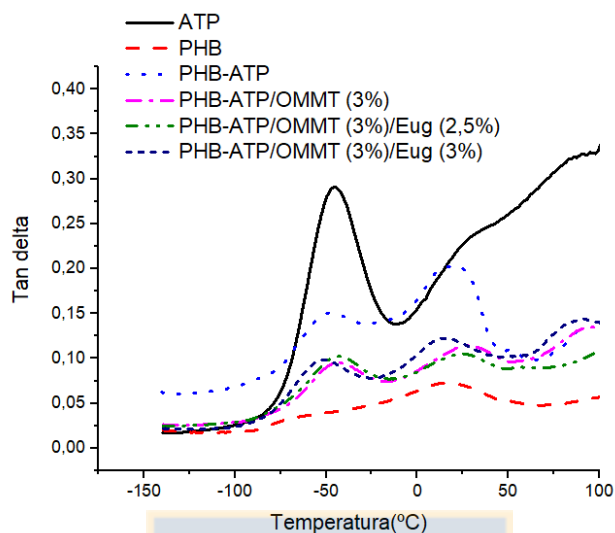


Figura 4.45. Tan delta como función de la temperatura. Fuente: elaboración propia.

#### 4.5.4 Propiedades térmicas

Se determinó la estabilidad térmica de los materiales poliméricos a través del perfil de descomposición. En la figura 4.46 se observa que el ATP presenta dos etapas de descomposición. La primera etapa se encuentra aproximadamente a 130 °C y corresponde a la pérdida de agua.<sup>134</sup> Wilhelm y colaboradores<sup>155</sup> atribuyeron estas etapas a que la liberación de agua a altas temperaturas se produciría porque las moléculas de agua pueden difundir fácilmente por los enlaces H que se forman con los grupos OH de las unidades de amilopectina a lo largo de las cadena de almidón y la segunda corresponde a la degradación del almidón. La degradación del PHB ocurre en dos etapas, la primera (299 °C) asociada a la ruptura de los grupos éster del PHB y la segunda etapa (410 °C) se atribuye al plastificante que posee el PHB comercial.<sup>91</sup> En la mezcla y los bionanocompuesto se observan dos etapas de descomposición. La primera etapa es la descomposición PHB-ATP (~ 301 °C) y la segunda al aditivo presente en el PHB comercial (410 °C).

Los bionanocompuestos presentan un desplazamiento a mayores temperaturas de  $T_{5\%}$  y  $T_{10\%}$  que la mezcla PHB-ATP, esta diferencia sería atribuido a la presencia de arcilla la que reorganiza las cadenas de almidón.<sup>155</sup>

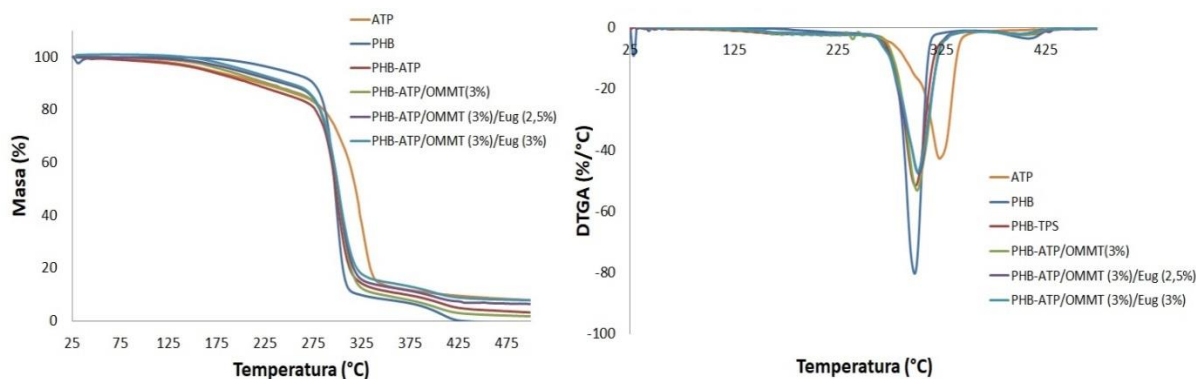


Figura 4.46. Perfil de descomposición térmica para ATP, PHB y PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%). Fuente: elaboración propia.

La figura 4.47 muestra los termogramas (DSC) del segundo calentamiento, el PHB presenta una temperatura de fusión ( $T_f$ ) de 168 °C. La mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos presenta una  $T_{f1}$  menor que el PHB (~162 °C). Esta disminución se produciría por la presencia del ATP e indicaría que en la mezcla PHB-ATP se obtiene una separación de fases, la que se obtiene cuando la mezcla de polímeros es no miscible,<sup>138</sup> y solo existen interacciones débiles entre los polímeros. Además con la presencia de arcilla restringe la movilidad de las cadenas de PHB lo que conduciría a un cristal menos perfecto y por lo tanto el pico de fusión se desplazaría a una temperatura más baja.<sup>157</sup> La temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y la entalpia de cristalización ( $\Delta H_c$ ) disminuyeron para la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos, atribuible a que el ATP y la arcilla actúan como agentes nucleantes<sup>119</sup> lo que facilita el proceso de cristalización y disminuye la  $T_c$  con respecto al PHB. Como existe una gran cantidad de centros de nucleación por la dispersión de la arcilla y la presencia del ATP, se va a producir un gran número de cristales pequeños que hace que la  $\Delta H_c$  disminuya.<sup>158</sup>



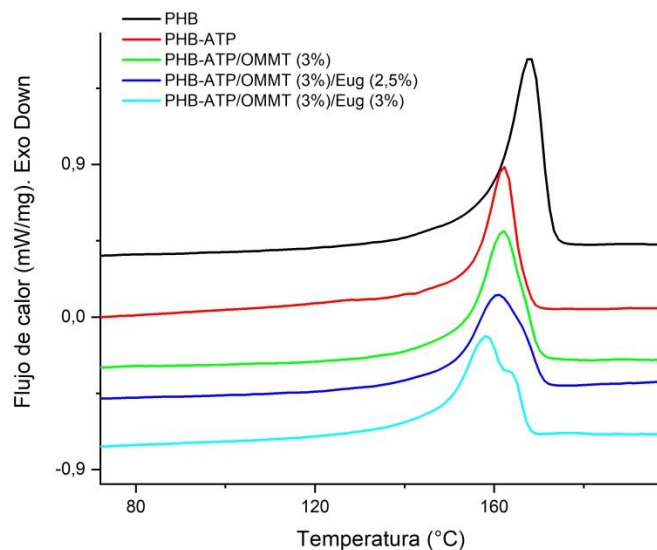


Figura 4.47. Termogramas DSC. Segundo calentamiento para PHB y PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) . Fuente: elaboración propia.

La tabla 4.17 muestra que el grado de cristalinidad aumentó un 10% y un 14% para la mezcla PHB-ATP y para el bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT (3%), respectivamente con respecto a la del PHB. Los bionanocompuestos con eugenol presentan un grado de cristalinidad muy similar a la de mezcla. Algunos autores como Janigova<sup>159</sup> y Abdelwahab<sup>119</sup> concluyeron que un aumento en el grado de cristalinidad con respecto a la del polímero puro se atribuye a un mejor empaque de los segmentos, además de una buena dispersión la arcilla en la matriz polimérica lo que fomenta el efecto de nucleación,<sup>160</sup> que por lo tanto produciría una disminución en la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) tal como se muestra en la tabla 4.18.

Tabla 4.17. Propiedades térmicas DCS y TGA para PHB, ATP y los diferentes bionanocompuestos.

Muestras	T <sub>f</sub> [°C]	T <sub>c</sub> [°C]	$\Delta H_m$ (J/g)	$\Delta H_c$ (J/g)	X <sub>c</sub> (%)	T <sub>d</sub> [°C]	T <sub>5%</sub> (°C)	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>50%</sub> (°C)
ATP						323,3	166,7	221,7	318,7
PHB	168,0	111,9	74,22	64,98	50,84	299,2	241,3	274,3	297,3
PHB-ATP	162,0	107,1	52,53	42,00	55,35	299,8	163,0	210,0	298,0
PHB-ATP/OMMT(3%)	162,1	106,5	57,13	46,69	63,45	301,5	182,4	227,4	299,4

PHB-ATP/OMMT(3%)/Eug (2,5%)	160,9	106,4	48,17	38,82	53,71	303,0	194,7	243,7	299,7
PHB-ATP/OMMT(3%)/Eug (3%)	158,3	103,6	52,56	40,54	58,92	302,0	204,9	249,9	300,9

Analizadas las propiedades morfológicas, mecánicas y térmicas de los bionanocompuestos con eugenol, se procede a determinar la actividad antioxidante y antifúngica de PHB y PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) con fin de determinar el efecto de eugenol en los bionanocompuestos.

El desarrollo de materiales poliméricos con propiedades antifúngicas y antioxidantes está directamente relacionado con la seguridad alimentaria y la extensión de la vida útil de los alimentos. Un sistema de envasado antifúngico se desarrolla para reducir, inhibir o retrasar el crecimiento de patógenos<sup>161</sup> como por ejemplo *Botrytis cinérea* (moho gris), que afecta particularmente a tomates, frutos rojos como frutillas, frambuesas y uvas y también afecta a cebollas, ajos y tubérculos.

Un envase de material polimérico con propiedades antioxidantes permitiría retrasar la oxidación de los lípidos, que es un factor principal en la pérdida de calidad de los alimentos y la reducción de la vida útil. Los procesos oxidativos en los productos alimenticios conducen a la degradación de lípidos y proteínas que, a su vez, contribuyen al deterioro del sabor, la textura y el color de los productos.<sup>162</sup>

#### 4.5.5 Actividad antioxidante de las películas de bionanocompuestos

Se evaluó la capacidad antioxidante de PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) mediante el ensayo con el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el que se decolora en presencia de compuestos con capacidad captadora de radicales. El ensayo DPPH consiste en medir la capacidad de los compuestos antioxidantes para atrapar radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno siguiendo la absorbancia a 515 nm.

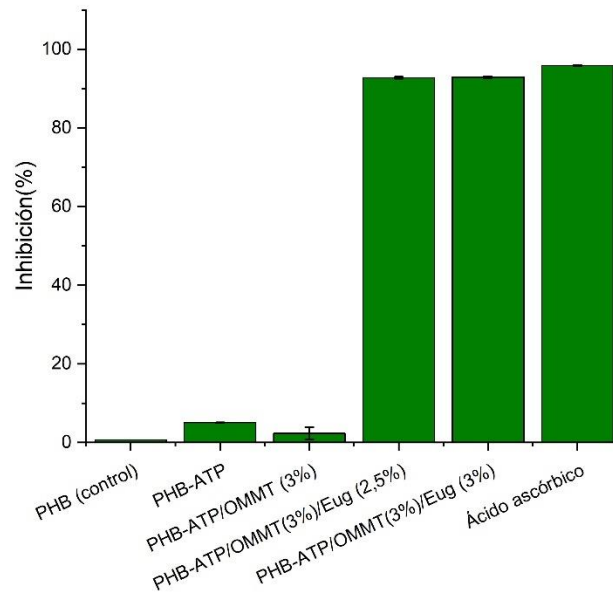


Figura 4.48. Eliminación de radicales libres (DPPH) para PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) . El PHB es la muestra control y el ácido ascórbico el control positivo. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.48 muestra que la mezcla PHB-ATP y PHB-ATP/OMMT(3%) presentaron una eliminación de radicales libres de 5 y 2,35% respectivamente y los bionanocompuestos con 2,5 y 3% m/m de eugenol presentaron un porcentaje de eliminación de un 92% aproximadamente. Para el caso del control positivo (ácido ascórbico) se obtuvo un porcentaje de eliminación de un 95%, valor muy cercano al obtenido por los bionanocompuestos con eugenol. Con estos resultados la actividad antioxidante solo es atribuible al eugenol, el cual con bajas concentraciones en el bionanocompuestos obtiene altos porcentajes de eliminación de radicales libres, el que sería atribuible por algunos autores a que el eugenol reduce dos o más radicales de  $\bullet\text{DPPH}^{24}$  debido a que dimeriza y forma el deshidrodieugenol<sup>163</sup> el que reacciona con el  $\bullet\text{DPPH}$ , tal como lo muestra la figura 4.49.

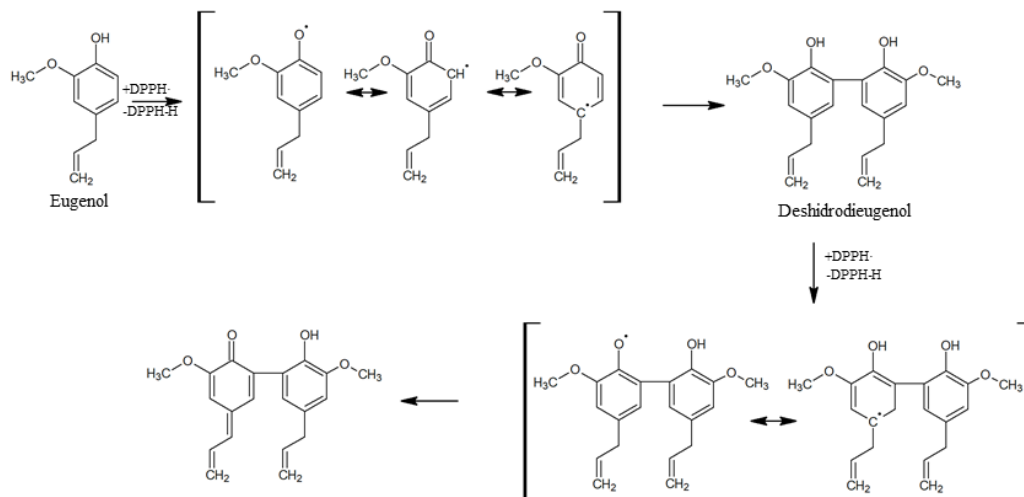


Figura 4.49. Posible mecanismo para la reacción entre eugenol y DPPH•.<sup>163</sup>

Los altos porcentajes de eliminación de radicales obtenidos concuerdan con investigación que utilizó eugenol pero impregnado en polietileno lineal de baja densidad (LLDPE) donde se obtuvo un 80% de inhibición de radicales con concentración de 1 y 5% de eugenol.<sup>26</sup> Otra investigación determinó una inhibición de radicales del 50% para pellet de harina termoplástica que contenía nanopartículas de quitosano con una concentración de 0,7 % masa/masa de eugenol.<sup>27</sup>

#### 4.5.6 Ensayo antifúngico

La actividad antifúngica se determinó calculando el área inhibición que presentaban el PHB, PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT(3%), PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) luego de 7 días en contacto con *Botrytis cinérea*. La figura 4.50 muestra el efecto fungicida de los bionanocompuestos con eugenol, los que presentan una clara zona de inhibición después de 7 días. PHB, PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT(3%) no presentaron inhibición contra *Botrytis cinérea* permitiendo el crecimiento del hongo por todo el contorno de la película, reflejando la ausencia de actividad antifúngica de estos componentes. Con estos resultados se comprueba que la actividad antifúngica solo se atribuye al eugenol, el que mantiene sus propiedades cuando se encuentra en el bionanocompuesto.

La tabla 4.18 muestra que mientras mayor es la concentración de eugenol en el bionanocompuesto, mayor área de inhibición se obtiene. Se determinó un área de inhibición de 4,71 cm<sup>2</sup> para PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (2,5%) con una concentración real de 1,5% m/m de eugenol y el PHB-ATP/OMMT(3%)/ Eug (3%) presentó un área de inhibición de 6,44 cm<sup>2</sup> con una concentración real de eugenol de

2% m/m. Si bien los bionanocompuestos muestran una diferencia entre la concentración de eugenol agregada y la concentración real en el material, esta permite obtener una inhibición significativa al crecimiento de *Botrytis cinérea*.

La diferencia de concentración de eugenol está asociada al proceso de obtención de los bionanocompuestos (altas temperaturas, largos tiempo de cizalla) y a la volatilidad que presentan los aceites esenciales (presión de vapor de 0,022 mm de Hg a 25 °C, Eugenol).<sup>164</sup>

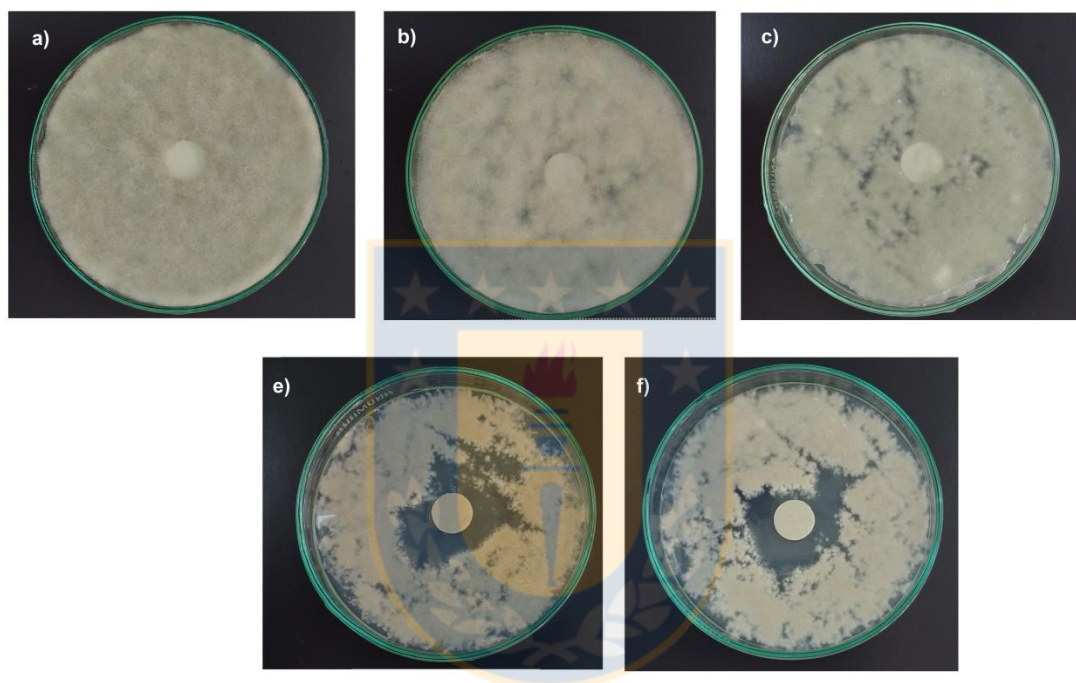


Figura 4.50. Actividad antifúngica contra *Botrytis cinérea* para a) PHB b)PHB-ATP c)PHB-ATP/OMMT (3%) d) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%) y e) PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%) después de 7 días. Fuente: elaboración propia.

El mecanismo de acción del eugenol como fungicida ha sido estudiado por varios autores y han determinado que el eugenol induce anomalías morfológicas las cuales evitan el crecimiento del hongo, ya que ataca la membrana y la pared celular,<sup>165</sup> esto ocurre porque el eugenol afecta la biosíntesis del ergosterol (componente de la membrana celular de los hongos) interfiriendo en la integridad y funcionamiento de la membrana.<sup>166</sup>

Tabla 4.18. Concentración de eugenol en los bionanocompuestos obtenidos por extrusión y actividad antifúngica de las muestras con y sin eugenol.

Muestra	Concentración Eugenol
---------	-----------------------

	Concentración de eugenol (% m/m)	Concentración Real (% m/m)	Área de inhibición contra <i>Botrytis cinérea</i> (cm <sup>2</sup> )
PHB	-	-	0
PHB-ATP	-	-	0
PHB-ATP/ OMMT (3%)	-	-	0
PHB-ATP/OMMT (3%)/Eug (2,5%)	2,5	1,56±0,13	4,71± 2,18
PHB-ATP/OMMT (3%)/Eug (3%)	3,0	2,00± 0,07	6,44± 2,50

Un envase de material polimérico biodegradable es una de las soluciones para contrarrestar el problema ambiental producido por residuos de envases de polietileno, polipropileno o polietileno tereftalato (polímeros sintéticos) los que necesitan largos periodos de tiempo para degradarse (~ 100 años).

Un plástico degradable en condiciones de degradación produce fragmentos de menor peso molecular producidos por la acción de microorganismos naturales como bacterias, hongos y algas.<sup>167</sup> De acuerdo con la definición ISO<sup>168</sup> "Un plástico degradable está diseñado para someterse a un cambio en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas, lo que resulta en la pérdida de algunas propiedades".

Un plástico puede ser degradable sin ser biodegradable, es decir, podría desintegrarse en pedazos o incluso en un polvo invisible, pero no ser asimilado por microorganismos. Un plástico puede ser degradable y biodegradable sin ser compostable, es decir, puede biodegradarse a una velocidad demasiado lenta como para ser llamado compostable.<sup>169</sup>

#### 4.5.7 Desintegración bajo condiciones de compostaje

Con el fin de analizar el comportamiento de las diferentes muestras obtenidas es que se empleó un método para determinar el grado de desintegración de las muestras bajo condiciones de compostaje aeróbico según la norma ISO 20200. La norma ISO 20200 define como desintegrable una muestra con un 90% de desintegración en un máximo de 90 días, lo que significa que no debe retenerse más del 10% del peso seco original en un tamiz de 2 mm.

El ensayo se realizó en un periodo de tiempo de 42 días, para las cuales se extraían cada 7 días los triplicados de las muestras de PHB, la mezcla PHB-ATP, los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT (3%), PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%). La Figura 4.51 muestra las diferentes películas poliméricas recuperadas en diferentes tiempos de ensayo.

En el día 7 (Figura 4.51) el PHB no sufre ningún cambio visual, a diferencias de las otras muestras que existe un cambio en sus aspectos, se tornan un poco blancas y marrón, cambios que se relacionan con la absorción de agua y por el proceso de degradación hidrolítica<sup>170</sup> que podría atribuirse a la presencia de ATP, para el caso de mezcla y de los bionanocompuestos. En el día 14 (Figura 4.51) el PHB comienza a sufrir cambios y la mezcla y los bionanocompuestos continúan cambiando su color. En el día 21 (Figura 4.51) el PHB, la mezcla y los bionanocompuestos comienzan a descomponerse, presentando erosiones en la superficie, además se vuelven mucho más frágiles. En el día 28 (Figura 4.51) comienzan a degradarse todas las muestras, las películas poliméricas reducen su tamaño original, presentando fragmentos de diferentes dimensiones. En el día 42 (Figura 4.51) las muestras superaron el 90% de degradación a excepción del PHB que se degradó hasta un 73% aproximadamente. Por la alta tasa de degradación es que ya se comienzan a encontrar fragmentos pequeños, hasta en ocasiones en algunos triplicados no se observó la presencia de fragmentos, indicando que la muestra se degradó totalmente o que se redujo a tamaños menores de 2 mm logrando atravesar la malla que contenía la muestra.

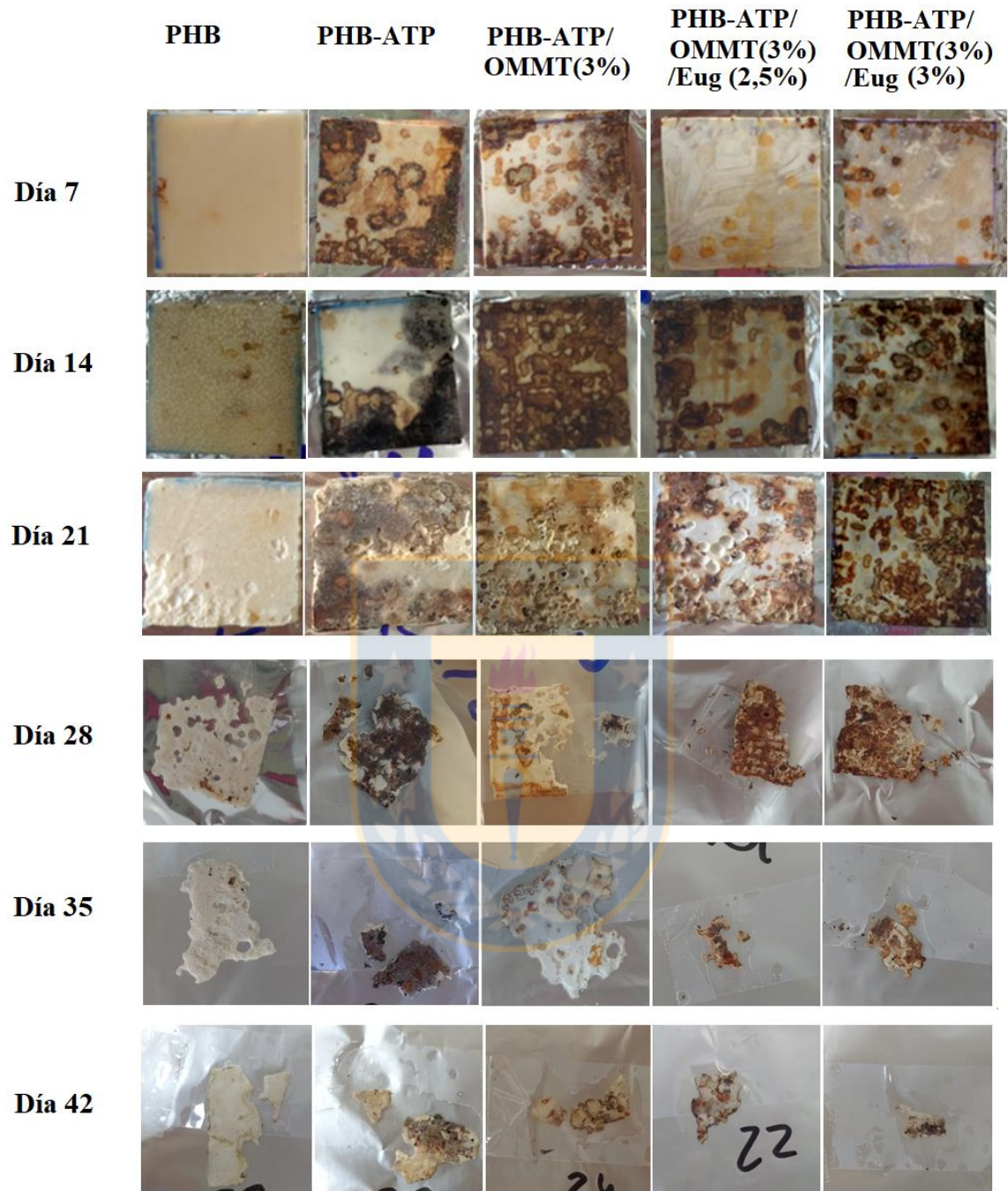


Figura 4.51. Fotografías de las diferentes muestras luego de ser extraídas del compost a diferentes días. Fuente: elaboración propia.

La figura 4.52 representa los porcentajes de degradación obtenidos para PHB, la mezcla PHB-ATP, los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT (3%), PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%). Los días 7 y 14 (figura 4.52 ) no muestran cambios significativos, ya que la degradación para la



mezcla y los bionanocompuestos es aproximadamente un 10% y para el PHB de un 3%, lo que indicaría que el ATP influye en la degradación de los materiales, esto como consecuencia de su carácter hidrófilo, lo que facilita el ataque de agua por la presencia de grupos hidroxilos disponibles, así permite la hidrólisis<sup>160</sup> en la mezcla PHB-ATP y los bionanocompuestos, contribuyendo en acelerar la degradación.<sup>112</sup>

El día 21 (figura 4.52) muestra un aumento en la tasa de degradación del PHB alcanzando un 13%, lo que indicaría que es la fase inicial de degradación, que comienza por la erosión de la superficie del polímero, la cual es producida por los microorganismos que se extenderán gradualmente dentro de la matriz polimérica.<sup>171</sup> Rosa y colaboradores determinaron que las cadenas de alto peso molecular del PHB comienzan a hidrolizar produciendo cadenas de menor peso molecular las cuales serán más susceptible al ataque de hongos o microorganismos.<sup>172</sup> La mezcla aumento su tasa de desintegración hasta un 30%, el bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT (3%) un 36%, el bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%) un 31% y el bionanocompuesto PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%) un 20%. Al analizar PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%) muestra el menor porcentaje de desintegración, atribuido a la mayor concentración de eugenol el que disminuiría la acción del microorganismo. Además, la arcilla no muestra una influencia significativa en el proceso de degradación, a pesar de ser una carga hidrofóbica, lo que podría dificultar la difusión de agua y por lo tanto la degradación.

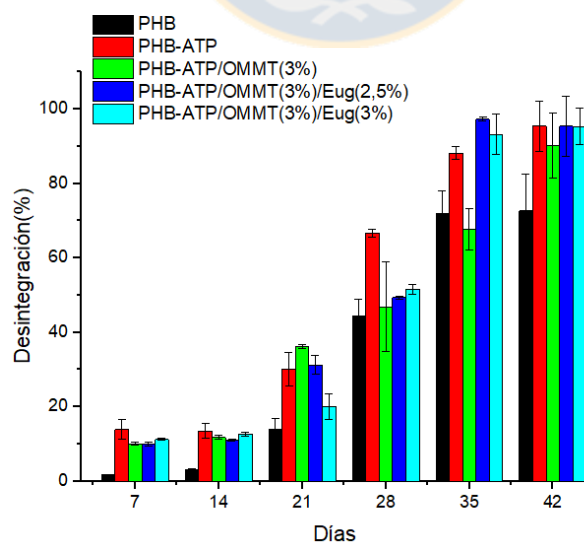


Figura 4.52. Porcentaje de desintegración de las diferentes películas bajo condiciones de compostaje en función del tiempo. Fuente: elaboración propia.

El día 28 (figura 4.52) muestra un 66% de degradación para PHB-ATP, aumentando un 36% desde el día 21 al 28, lo que podría atribuirse a que el almidón acelera la velocidad de degradación. Los bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT (3%), PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (2,5%) y PHB-ATP/OMMT (3%)/ Eug (3%) presentaron un aumento de un 10%, 18% y un 31%, respectivamente. Los bionanocompuestos no superan la tasa de desintegración de la mezcla, atribuido a que la arcilla estaría retrasando o evitando que los bionanocompuestos se degraden más rápido. La arcilla impide el movimiento de las cadenas de los polímeros, lo que dificulta la hidrólisis, permitiendo solo una degradación superficial.<sup>173</sup> Desde el día 28 los bionanocompuestos con eugenol (2,5 y 3%) se comenzaron a degradar más rápido que el bionanocompuesto sin eugenol lo que podría atribuirse a que el contenido de eugenol comienza a perderse a medida que va ocurriendo el ensayo. Un efecto similar fue analizado por el grupo de la Dra. Arrieta en que su mezcla terciaria de PLA-PHB-Limoneno, se degradaba más rápidamente que sus otras muestras, comprobando que con el transcurso del tiempo el limoneno disminuía su concentración en las muestras.<sup>174</sup>

En los días 35 y 42 (figura 4.52) de compostaje los bionanocompuestos con eugenol alcanzaron aproximadamente el 95% de desintegración. La mezcla y el bionanocompuesto sin eugenol superaron el 90% desintegración en el día 42, lo que indica que estas muestras presentan una naturaleza compostable, ya que superaron el 90% de desintegración definido por la norma. El PHB no alcanzó el objetivo de degradarse completamente en el día 42, donde se desintegro un 73% indicando que necesitaba más tiempo para degradarse completamente. Por lo tanto, se favorece la desintegración del PHB con la presencia de ATP, arcilla y eugenol.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se obtuvo por mezclado en estado fundido la mezcla PHB-ATP, bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT y bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT/Eugenol. Se determinaron las propiedades morfológicas, mecánicas, térmicas, antifúngicas, antioxidantes y de degradación, las que se resumen a continuación:

- a) Obtención de mezcla PHB-ATP.
  - Estructuralmente se comprobó que existen interacciones intermoleculares entre el PHB y el ATP.
  - La concentración de ATP determina la rigidez de la mezcla PHB-ATP, un 35% m/m resulta es un material polimérico flexible (660 MPa) como el polietileno (409 MPa) y con un 25% m/m resulta un material polimérico rígido (1120 MPa) como el polipropileno (1860 MPa).
  - Se determinó por análisis térmico (DSC y TGA) que la presencia de almidón aumentó la ventana de procesamiento del PHB, debido a que disminuyó la temperatura de fusión y aumentó la temperatura de descomposición, lo que fue atribuido a una baja interacción interfacial entre los polímeros.
  
- b) Obtención de bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT.
  - Los bionanocompuestos de PHB-ATP incorporando 1, 3 y 5% m/m de arcilla montmorillonita modificada presentaron una morfología combinada intercalada y exfoliada lo que fue determinada por DRX y TEM.
  - Se analizó la influencia de la arcilla en las propiedades mecánicas y nanomecánicas. A altas concentraciones de arcillas el bionanocompuesto aumenta la rugosidad, el módulo elástico y la dureza, con respecto a la mezcla PHB-ATP.
  - Las propiedades térmicas de los bionanocompuestos, tales como; la temperatura de fusión, cristalización y descomposición no presentan cambios significativos con respecto al PHB. El grado de cristalinidad disminuye con la presencia de arcilla.
  
- c) Obtención de bionanocompuestos PHB-ATP/OMMT/Eugenol.

- La presencia de eugenol no afecta la morfología de los bionanocompuestos (morfologías intercaladas y exfoliadas). Lo que fue corroborado por DRX y TEM.
- Al analizar la superficie por SEM se determinó que con un mayor contenido de eugenol se produce una disminución de los gránulos de almidón producto de la mejor compatibilidad entre PHB-ATP.
- Todos los bionanocompuestos presentaron un aumento del módulo elástico (tensión) con respecto al PHB-ATP, por el efecto reforzante de la arcilla.
- Con la incorporación del eugenol en el bionanocompuesto no hay cambios significativos en las propiedades térmicas con respecto a la mezcla PHB-ATP, lo que indica que contrarresta el efecto de la arcilla.
- Mediante análisis en *vitro* se evaluó la capacidad antifúngica de los diferentes materiales, donde se estableció que la presencia de eugenol en los bionanocompuestos permitió inhibir el crecimiento del hongo *Botrytis cinérea* en un ensayo de 7 días. Por el contrario, el PHB, la mezcla PHB-ATP y el bionanocompuesto no presentaron ninguna actividad, atribuyendo la inhibición principalmente al aceite esencial.
- El estudio de la capacidad antioxidante mediante DPPH• mostró que los bionanocompuestos con eugenol presentaron altos porcentajes de inhibición de radicales libres alcanzando valores muy próximos al del control positivo (ácido ascórbico), a diferencia de los otros materiales poliméricos que no presentaron actividad antioxidante significativa.
- La capacidad antifúngica y antioxidante es atribuida exclusivamente a la presencia de eugenol, las que se mantienen al ser expuestas a un proceso de mezclado en estado fundido (160 °C).
- Todos los materiales poliméricos fueron sometidos a condiciones de compostaje. PHB-ATP, PHB-ATP/OMMT y PHB-ATP/OMMT/Eugenol se degradaron en el día 42 de ensayo, a excepción del PHB (73% de desintegración). Atribuyendo el efecto de desintegración al almidón.

Los bionanocompuestos PHB-ATP (65:35)/OMMT(3%)/Eugenol poseen las propiedades necesarias para ser utilizados como un material polimérico para envases de alimentos (envase activo). La actividad antioxidante determinada permitiría evitar la oxidación de lípidos. La actividad antifúngica favorecería inhibir el crecimiento de hongos. Por otra parte, estos bionanocompuestos son totalmente degradable (ISO 20200) en cortos periodos de tiempo.

## 5.1 Perspectiva

Debido a los interesantes resultados obtenidos en esta tesis doctoral en torno a las propiedades térmicas, mecánicas, antifúngica, antioxidante y biodegradable de los bionanocompuestos PHB-ATP/Arcilla/Eugenol, se podrían realizar ensayos *in vivo* frente a frutas que son susceptibles al ataque de *Botrytis cinérea*, tales como uvas, frutillas o a productos sensibles a la oxidación como manzanas o productos lácteos como yogurt, para analizar el efecto real del material polimérico obtenido. Esto desde el punto de vista de potenciar y enfatizar la capacidad antifúngica y antioxidante determinada en los bionanocompuestos. Además, se podría analizar la actividad antifúngica *in vitro* con respecto a otros hongos tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* o *Rhizopus* que encuentran en la lechuga, cebada, limón y pan respectivamente.

Evaluar la liberación del aceite esencial (Eugenol) mediante diferentes ensayos tales como volatilización hacia el ambiente o simulador de alimento con el fin de determinar el tiempo máximo de actividad que presentaría el eugenol y como es su comportamiento con el paso del tiempo.

Obtener bionanocompuestos con diferentes organomodificadores en la arcilla para determinar cómo puede variar la liberación de eugenol y las propiedades mecánicas.

## REFERENCIAS.

1. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. & Ahmed, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* **26**, 246–65 (2008).
2. Europe, P. *Plastics-the facts 2017, An analysis of European plastics production, demand and waste data; 2017.* (2017). doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.015
3. Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 621–632 (2010).
4. Commission, E. Plastic Waste : Ecological and Human Health Impacts. *Sci. Environ. Policy* 41 (2011).
5. European commission. Plastic Waste in the Environment. *Sci. Environ. Policy* 1–37 (2011). doi:KH-31-13-768-EN-N
6. POLYMIX. *Informe LAYMAN.* (2014).
7. Greene, J. Biodegradation of compostable plastics in green yard-waste compost environment. *J. Polym. Environ.* **15**, 269–273 (2007).
8. BORDES, P., POLLET, E. & AVEROUS, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 125–155 (2009).
9. European Bioplastics. *Bioplastics market data 2017 - Global production capacities of bioplastics 2017-2022.* (2017). at <[http://docs.european-bioplastics.org/publications/market\\_data/2017/Report\\_Bioplastics\\_Market\\_Data\\_2017.pdf](http://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/2017/Report_Bioplastics_Market_Data_2017.pdf)>
10. Sinha Ray, S. & Okamoto, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog. Polym. Sci.* **28**, 1539–1641 (2003).
11. Consumo, C. E. Comercio Exterior y Proyecciones. (2013).
12. Vermeiren, L., Devlieghere, F., Beest, M. Van, Kruijf, N. De & Debevere, J. Developments in the active packaging of foods. **10**, 77–86 (1999).
13. Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Puoci, F., Vinci, G. & Picci, N. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control* **21**, 1425–1435 (2010).
14. Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K. & McHugh, T. H. Innovative food packaging solutions. *J. Food Sci.* **73**, (2008).

15. Quintavalla, S. & Vicini, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **62**, 373–380 (2002).
16. Guiga, W., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P., Carnet-Pantiez, A. & Sebti, I. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **10**, 203–207 (2009).
17. Narayanan, A., Neera, Mallesha & Ramana, K. V. Synergized antimicrobial activity of eugenol incorporated polyhydroxybutyrate films against food spoilage microorganisms in conjunction with pediocin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**, 1379–1388 (2013).
18. Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Maroto, J. & Cruz, J. M. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **12**, 50–55 (2011).
19. Moore, M. E., Han, I. Y., Acton, J. C., Ogale, a. a., Barmore, C. R. & Dawson, P. L. Effects of Antioxidants in Polyethylene Film on Fresh Beef Color. *J. Food Sci.* **68**, 99–104 (2003).
20. López-de-Dicastillo, C., Gómez-Estaca, J., Catalá, R., Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chem.* **131**, 1376–1384 (2012).
21. *Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties.* (CRC Press, 2013). at <https://books.google.com/books?id=zLLMBQAAQBAJ&pgis=1>
22. Granda-Restrepo, D. M., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Troncoso-Rojas, R., Vallejo-Córdoba, B., Gámez-Meza, N. & Graciano-Verdugo, A. Z. Migration of  $\alpha$ -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Res. Int.* **42**, 1396–1402 (2009).
23. Ruberto, G. & Baratta, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* **69**, 167–174 (2000).
24. Gülçin, İ. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *J. Med. Food* **14**, 975–985 (2011).
25. Rajendran, M. P., Pallaiyan, B. B. & Selvaraj, N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves. *Avicenna J. phytomedicine* **4**, 200–14 (2014).
26. Goñi, M. L., Gañán, N. A., Strumia, M. C. & Martini, R. E. Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. *J. Supercrit. Fluids* **111**, 28–35 (2016).

27. Woranuch, S. & Yoksan, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. *Carbohydr. Polym.* **96**, 586–592 (2013).
28. Gyawali, R. & Ibrahim, S. a. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* **46**, 412–429 (2014).
29. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 223–53 (2004).
30. Sung, S., Tin, L., Tan, A. & Vikhraman, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol.* **33**, 110–123 (2013).
31. Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M. & Garrigós, M. C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng.* **109**, 513–519 (2012).
32. Persico, P., Ambrogi, V., Carfagna, C., Cerruti, P., Ferrocino, I. & Mauriello, G. Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polym. Eng. Sci.* **49**, 1447–1455 (2009).
33. Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Pérez, M. a., Garrido-Miranda, K. a. & Pereira, E. D. Polymer/clay nanocomposite films as active packaging material: Modeling of antimicrobial release. *Eur. Polym. J.* **71**, 461–475 (2015).
34. Tunç, S. & Duman, O. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release. *LWT - Food Sci. Technol.* **44**, 465–472 (2011).
35. Inouye, S., Uchida, K. & Yamaguchi, H. In-vitro and in-vivo anti-Trichophyton activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses* **44**, 99–107 (2001).
36. Veldhuizen, E. J. a, Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L. M., Zweijtzer, C., Burt, S. a & Haagsman, H. P. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1874–9 (2006).
37. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., Egido, J. & Marín, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 145–154 (2003).
38. Valverde, J. M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Serrano, M. & Valero, D. Improvement of table grapes quality and safety by the combination of modified atmosphere packaging (MAP) and eugenol, menthol, or thymol. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7458–7464 (2005).
39. Li, B., Kennedy, J. F., Peng, J. L., Yie, X. & Xie, B. J. Preparation and



- performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydr. Polym.* **65**, 488–494 (2006).
40. Alexandre, M. & Dubois, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **28**, 1–63 (2000).
  41. Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K. & Mohanty, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 1653–1689 (2013).
  42. Karimi, S., Dufresne, A., Md. Tahir, P., Karimi, A. & Abdulkhani, A. Biodegradable starch-based composites: Effect of micro and nanoreinforcements on composite properties. *J. Mater. Sci.* **49**, 4513–4521 (2014).
  43. Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J. & Youngblood, J. *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites*. *Chem. Soc. Rev.* **40**, (2011).
  44. Baur, J. & Silverman, E. Challenges and Opportunities for Nanotechnology in Multi-Functional Composite Structures. (2006).
  45. Klein, C. & Hurlbut, C. S. *Manual de mineralogía, Volume 2*. (Reverte, 1997). at <[http://books.google.com/books?id=ol2xn\\_6jgn0C&pgis=1](http://books.google.com/books?id=ol2xn_6jgn0C&pgis=1)>
  46. Grim, R. . *Clay Mineralogy*. (1968).
  47. G., L. *From clay mineral crystals to colloidal clay mineral dis- persions*. In: *Dobias B, editor. Coagulation and flocculation—theory and applications*. (1993).
  48. Liz-Marzán, L. M. Nanometals. *Mater. Today* **7**, 26–31 (2004).
  49. Paul, D. R. & Robeson, L. M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer (Guildf)*. **49**, 3187–3204 (2008).
  50. Pavlidou, S. & Papaspyrides, C. D. A review on polymer–layered silicate nanocomposites. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 1119–1198 (2008).
  51. Rhim, J.-W., Park, H.-M. & Ha, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 1629–1652 (2013).
  52. Bordes, P., Pollet, E. & Averous, L. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 125–155 (2009).
  53. Hotta, S. & Paul, D. R. Nanocomposites formed from linear low density

- polyethylene and organoclays. *Polymer (Guildf)*. **45**, 7639–7654 (2004).
54. Lotti, C., Isaac, C. S., Branciforti, M. C., Alves, R. M. V., Liberman, S. & Bretas, R. E. S. Rheological , mechanical and transport properties of blown films of high density polyethylene nanocomposites. *Eur. Polym. J.* **44**, 1346–1357 (2008).
  55. Mascheroni, E., Guillard, V., Gastaldi, E., Gontard, N. & Chalier, P. Anti-microbial effectiveness of relative humidity-controlled carvacrol release from wheat gluten/montmorillonite coated papers. *Food Control* **22**, 1582–1591 (2011).
  56. Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N. & Gastaldi, E. Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *J. Memb. Sci.* **289**, 159–168 (2007).
  57. Pérez, M. ., Rivas, B. ., Garrido-Miranda, Karla.; Campos-Requena, V. ., Martínez, M. ., Castaño, J. . & Maldonado, Á. Low density polyethylene (LDPE) nanocomposites with passive and active barrier properties. *J. Chil. Chem. Soc.* **58**, 2248–2252 (2014).
  58. Morlat-Therias, S., Mailhot, B., Gonzalez, D. & Gardette, J. L. Photooxidation of polypropylene/montmorillonite nanocomposites. 2. Interactions with antioxidants. *Chem. Mater.* **17**, 1072–1078 (2005).
  59. Passaglia, E., Bertoldo, M., Coiai, S., Augier, S., Savi, S. & Ciardelli, F. Nanostructured polyolefins / clay composites : role of the molecular interaction at the interface. *Polym. Adv. Technol.* **19**, 560–568 (2008).
  60. Wong, W.-K., Cheng, S., Li, C. Y., Ahmad, I., Cairncross, R. & Hsuan, Y. G. Depletion mechanism of antioxidants in MDPE-clay nanocomposites under thermal aging. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 192–199 (2012).
  61. Mittal, V. Polymer Layered Silicate Nanocomposites: A Review. *Materials (Basel)*. **2**, 992–1057 (2009).
  62. Komori, Y. and Kurada, K. Layered silicate – Polymer Intercalation Compounds. (2000).
  63. Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Pérez, M. a, 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. *Polym. Int.* **62**, 548–553 (2013).
  64. Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Pérez, M. A., Garrido-Miranda, K. A. & Pereira, E. D. Release of essential oil constituent from thermoplastic

starch/layered silicate bionanocomposite film as a potential active packaging material. *Eur. Polym. J.* **109**, 64–71 (2018).

65. Sorrentino, A., Gorrasi, G. & Vittoria, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 84–95 (2007).
66. Chang, J.-H., An, Y. U. & Sur, G. S. Poly(lactic acid) nanocomposites with various organoclays. I. Thermomechanical properties, morphology, and gas permeability. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **41**, 94–103 (2003).
67. Pluta, M., Galeski, A., Alexandre, M., Paul, M.-A. & Dubois, P. Polylactide/montmorillonite nanocomposites and microcomposites prepared by melt blending: Structure and some physical properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **86**, 1497–1506 (2002).
68. Ray, S. S. & Okamoto, M. Biodegradable Polylactide and Its Nanocomposites: Opening a New Dimension for Plastics and Composites. *Macromol. Rapid Commun.* **24**, 815–840 (2003).
69. Nam, P. H., Fujimori, A. & Masuko, T. The dispersion behavior of clay particles in poly(L-lactide)/organo-modified montmorillonite hybrid systems. *J. Appl. Polym. Sci.* **93**, 2711–2720 (2004).
70. Tang, M. C. & Agarwal, S. A model for water vapor permeability reduction in poly ( lactic acid ) and nanoclay nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* **46506**, 1–12 (2018).
71. Dahman, Y. & Ugwu, C. U. Production of green biodegradable plastics of poly(3-hydroxybutyrate) from renewable resources of agricultural residues. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **37**, 1561–8 (2014).
72. Corrêa, M. C. S., Branciforti, M. C., Pollet, E., Agnelli, J. a. M., Nascente, P. a. P. & Avêrous, L. Elaboration and Characterization of Nano-Biocomposites Based on Plasticized Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) with Organo-Modified Montmorillonite. *J. Polym. Environ.* **20**, 283–290 (2011).
73. Chen, G., Hao, G. & Guo, T. Structure and mechanical properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV)/clay nanocomposites. *J. Mater. Sci. Lett.* **21**, 1587–1589 (2002).
74. Akin, O. & Tihminlioglu, F. Effects of Organo-Modified Clay Addition and Temperature on the Water Vapor Barrier Properties of Polyhydroxy Butyrate Homo and Copolymer Nanocomposite Films for Packaging Applications. *J. Polym. Environ.* **26**, 1121–1132 (2018).

75. Park, H.-M., Li, X., Jin, C.-Z., Park, C.-Y., Cho, W.-J. & Ha, C.-S. Preparation and Properties of Biodegradable Thermoplastic Starch/Clay Hybrids. *Macromol. Mater. Eng.* **287**, 553–558 (2002).
76. Ayana, B., Suin, S. & Khatua, B. B. Highly exfoliated eco-friendly thermoplastic starch (TPS)/poly (lactic acid)(PLA)/clay nanocomposites using unmodified nanoclay. *Carbohydr. Polym.* **110**, 430–439 (2014).
77. Kwak, S.-Y. & Sei Oh, K. Effect of Thermal History on Structural Changes in Melt-Intercalated Poly(-caprolactone)/Organoclay Nanocomposites Investigated by Dynamic Viscoelastic Relaxation Measurements. *Macromol. Mater. Eng.* **288**, 503–508 (2003).
78. Di, Y., Iannace, S., Di Maio, E. & Nicolais, L. Nanocomposites by melt intercalation based on polycaprolactone and organoclay. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **41**, 670–678 (2003).
79. Botana, A., Mollo, M., Eisenberg, P. & Sanchez, R. M. T. Effect of modified montmorillonite on biodegradable PHB nanocomposites. *Appl. Clay Sci. J.* **47**, 263–270 (2010).
80. Panayotidou, E., Baklavaridis, A., Zuburtikudis, I. & Achilias, D. S. Nanocomposites of poly(3-hydroxybutyrate)/organomodified montmorillonite: Effect of the nanofiller on the polymer's biodegradation. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 1–8 (2015).
81. D'Amico, D. a., Manfredi, L. B. & Cyras, V. P. Crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyrate) nanocomposites based on modified clays: Effect of organic modifiers. *Thermochim. Acta* **544**, 47–53 (2012).
82. Magalhães, N. F. & Andrade, C. T. Properties of Melt-processed Poly (hydroxybutyrate-co- hydroxyvalerate )/ starch 1 : 1 Blend Nanocomposites. *Polímeros* **23**, 366–372 (2013).
83. Khanna, S. & Srivastava, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* **40**, 607–619 (2005).
84. Ojumu, T., Yu, J. & Solomon, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African J. Biotechnol.* **3**, 18–24 (2004).
85. Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **25**, 1503–1555 (2000).
86. Höfer, P., Vermette, P. & Groleau, D. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates by recombinant *Methylobacterium extorquens*:

- Combining desirable thermal properties with functionality. *Biochem. Eng. J.* **54**, 26–33 (2011).
87. Poirier, Y., Erard, N. & MacDonald-Comber Petétot, J. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5254–5260 (2001).
  88. Follain, N., Chappey, C., Dargent, E., Chivrac, F., Crétois, R. & Marais, S. Structure and barrier properties of biodegradable polyhydroxyalkanoate films. *J. Phys. Chem. C* **118**, 6165–6177 (2014).
  89. Akaraonye, E., Keshavarz, T. & Roy, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**, 732–743 (2010).
  90. Keshavarz, T. & Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 321–6 (2010).
  91. Panaitescu, D. M., Nicolae, C. A., Frone, A. N., Chiulan, I., Stanescu, P. O., Draghici, C., Iorga, M. & Mihailescu, M. Plasticized poly(3-hydroxybutyrate) with improved melt processing and balanced properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **134**, 1–14 (2017).
  92. Mekonnen, T., Mussone, P., Khalil, H. & Bressler, D. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *J. Mater. Chem. A* **1**, 13379–13398 (2013).
  93. Erceg, M., Kovačić, T. & Klarić, I. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) plasticized with acetyl tributyl citrate. *Polym. Degrad. Stab.* **90**, 313–318 (2005).
  94. Ruiz Avilés, G. Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Ing. y Cienc.* **2**, 5–28 (2006).
  95. Avérous, L. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **44**, 231–274 (2004).
  96. Alcázar-Alay, S. C. & Meireles, M. A. A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Sci. Technol.* **35**, 215–236 (2015).
  97. Halley, P. J. *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*. *Biodegrad. Polym. Ind. Appl.* (Elsevier, 2005). doi:10.1533/9781845690762.1.140
  98. Luckachan, G. E. & Pillai, C. K. S. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *J. Polym. Environ.* **19**, 637–676

(2011).

99. Avella, M., Errico, M. E., Rimedio, R. & Sadocco, P. Preparation of biodegradable polyesters/high-amylose-starch composites by reactive blending and their characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* **83**, 1432–1442 (2002).
100. Tang, X. & Alavi, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. *Carbohydr. Polym.* **85**, 7–16 (2011).
101. Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., Sin, L. T. & Yussuf, A. A. Approaches to improve compatibility of starch filled polymer system: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 2370–2377 (2009).
102. Imam, S. H., Chen, L., Gordon, S. H., Shogren, R. L., Weisleder, D. & Greene, R. V. Biodegradation of Injection Molded Starch-Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Blends in a Natural Compost Environment. *J. Polym. Environ.* **6**, 91–98 (1998).
103. Avella, M., Martuscelli, E. & Raimo, M. Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. *J. Mater. Sci.* **35**, 523–545 (2000).
104. Thiré, R. M. S. M., Ribeiro, T. A. A. & Andrade, C. T. Effect of starch addition on compression-molded poly(3-hydroxybutyrate)/starch blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **100**, 4338–4347 (2006).
105. Godbole, S. Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate–starch blend films. *Bioresour. Technol.* **86**, 33–37 (2003).
106. Innocentini-Mei, L. H., Bartoli, J. R. & Baltieri, R. C. Mechanical and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate) blends with starch and starch derivatives. *Macromol. Symp.* **197**, 77–87 (2003).
107. Lai, S.-M., Don, T.-M. & Huang, Y.-C. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/poly(hydroxy butyrate) blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **100**, 2371–2379 (2006).
108. Innocentini-Mei, L. H., Bartoli, J. R. & Baltieri, R. C. Mechanical and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate) blends with starch and starch derivatives. *Macromol. Symp.* **197**, 77–88 (2003).
109. Shang, L., Jiang, M. & Chang, H. Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1415–1419 (2003).
110. Bruzaud, S. & Bourmaud, A. Thermal degradation and (nano)mechanical

behavior of layered silicate reinforced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanocomposites. *Polym. Test.* **26**, 652–659 (2007).

111. Díez-pascual, A. M., Gómez-fatou, M. A. & Ania, F. Progress in Materials Science Nanoindentation in polymer nanocomposites. *J. Prog. Mater. Sci.* **67**, 1–94 (2015).
112. Seoane, I. T., Manfredi, L. B., Cyras, V. P., Torre, L., Fortunati, E. & Puglia, D. Effect of Cellulose Nanocrystals and Bacterial Cellulose on disintegrability in composting conditions of Plasticized PHB Nanocomposites. *Polymers (Basel)*. **9**, (2017).
113. Pushpadassa, H. A., Kumara, A., Jacksonb, D. S., Wehlingb, R. L., Dumaisc, J. J. & Hannaa, M. A. Macromolecular changes in extruded starch-films plasticized with glycerol, water and stearic acid. *Starch/Staerke* **61**, 256–266 (2009).
114. Lai, S. M., Don, T. M. & Huang, Y. C. Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/poly(hydroxy butyrate) blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **100**, 2371–2379 (2006).
115. Tajuddin, S., Xie, F., Nicholson, T. M., Liu, P. & Halley, P. J. Rheological properties of thermoplastic starch studied by multipass rheometer. *Carbohydr. Polym.* **83**, 914–919 (2011).
116. Magalhães, N. F. & Andrade, C. T. Thermoplastic corn starch/clay hybrids: Effect of clay type and content on physical properties. *Carbohydr. Polym.* **75**, 712–718 (2009).
117. Zuo, Y., Gu, J., Tan, H. & Zhang, Y. Thermoplastic starch prepared with different plasticizers: Relation between degree of plasticization and properties. *J. Wuhan Univ. Technol. Mater. Sci. Ed.* **30**, 423–428 (2015).
118. Zhang, M. & Thomas, N. L. Preparation and properties of polyhydroxybutyrate blended with different types of starch. *J. Appl. Polym. Sci.* **116**, 688–694 (2009).
119. Abdelwahab, M. a., Flynn, A., Chiou, B.-S., Imam, S., Orts, W. & Chiellini, E. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 1822–1828 (2012).
120. Zhang, M. I. N. & Thomas, N. L. Blending Polylactic Acid with Polyhydroxybutyrate: The Effect on Thermal , Mechanical , and Biodegradation Properties. *Adv. Polym. Technol.* **30**, 67–79 (2011).
121. Campoy, I., Gomez, M. A. & Marco, C. Structure and thermal properties of blends of nylon 6 and a liquid crystal copolyester †. *Polymer (Guildf)*. **39**, 6279–

6288 (1998).

122. Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L. & Holmes, P. A. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *J. Mater. Sci.* **19**, 2781–2794 (1984).
123. Reis, K. C., Pereira, J., Smith, A. C., Carvalho, C. W. P., Wellner, N. & Yakimets, I. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films. *J. Food Eng.* **89**, 361–369 (2008).
124. Hablot, E., Bordes, P., Pollet, E. & Avérous, L. Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems. *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 413–421 (2008).
125. Shah, R. K. & Paul, D. R. Organoclay degradation in melt processed polyethylene nanocomposites. *Polymer (Guildf)*. **47**, 4075–4084 (2006).
126. Carli, L. N., Daitx, T. S., Guégan, R., Giovanela, M., Crespo, J. S. & Mauler, R. S. Biopolymer nanocomposites based on poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) reinforced by a non-ionic organoclay. *Polym. Int.* (2014). doi:10.1002/pi.4781
127. Bordes, P., Pollet, E., Bourbigot, S. & Avérous, L. Structure and Properties of PHA/Clay Nano-Biocomposites Prepared by Melt Intercalation. *Macromol. Chem. Phys.* **209**, 1473–1484 (2008).
128. Bordes, P., Hablot, E., Pollet, E. & Avérous, L. Effect of clay organomodifiers on degradation of polyhydroxyalkanoates. *Polym. Degrad. Stab.* **94**, 789–796 (2009).
129. Xie, W., Gao, Z., Pan, W. P., Hunter, D., Singh, A. & Vaia, R. Thermal degradation chemistry of alkyl quaternary ammonium Montmorillonite. *Chem. Mater.* **13**, 2979–2990 (2001).
130. Khatua, B. B., Lee, D. J., Kim, H. Y. & Kim, J. K. Effect of Organoclay Platelets on Morphology of Nylon-6 and Poly(ethylene- r an -propylene) Rubber Blends. *Macromolecules* **37**, 2454–2459 (2004).
131. Ferreira, K. R. M., Leite, I. F., Siqueira, A. da S., Raposo, C. M. O., Carvalho, L. H. & Silva, S. M. L. The use of an organoclay on the compatibilization of PP/EPDM Blends. *Polímeros* **21**, 421–428 (2011).
132. Parvinezadeh, M., Moradian, S., Rashidi, A. & Yazdanshenas, M.-E. Effect of the Addition of Modified Nanoclays on the Surface Properties of the Resultant Polyethylene Terephthalate/Clay Nanocomposites. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **49**, 874–884 (2010).



133. Ataefard, M. & Moradian, S. Surface properties of polypropylene/organoclay nanocomposites. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 2320–2326 (2011).
134. Shanks, R. & Kong, I. in *Thermoplast. Elastomers* (ed. El-Sonbati, A.) 95–116 (2012, 2012). doi:10.5772/2038
135. Yue, H.-B., Fernandez-Blazquez, J. P., Shuttleworth, P. S., Cui, Y.-D. & Ellis, G. Thermomechanical relaxation and different water states in cottonseed protein derived bioplastics. *RSC Adv.* **4**, 32320 (2014).
136. Rodriguez-Gonzalez, F. ., Ramsay, B. . & Favis, B. . High performance LDPE/thermoplastic starch blends: a sustainable alternative to pure polyethylene. *Polymer (Guildf)*. **44**, 1517–1526 (2003).
137. Srubar, W. V., Wright, Z. C., Tsui, A., Michel, A. T., Billington, S. L. & Frank, C. W. Characterizing the effects of ambient aging on the mechanical and physical properties of two commercially available bacterial thermoplastics. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 1922–1929 (2012).
138. Matzinos, P., Tserki, V., Kontoyiannis, A. & Panayiotou, C. Processing and characterization of starch/polycaprolactone products. *Polym. Degrad. Stab.* **77**, 17–24 (2002).
139. Zhang, Y. Q., Lee, J. H., Rhee, J. M. & Rhee, K. Y. Polypropylene-clay nanocomposites prepared by in situ grafting-intercalating in melt. *Compos. Sci. Technol.* **64**, 1383–1389 (2004).
140. Yusoh, K., Jin, J. & Song, M. Subsurface mechanical properties of polyurethane/organoclay nanocomposite thin films studied by nanoindentation. *Prog. Org. Coatings* **67**, 220–224 (2010).
141. Shen, L., Phang, I. Y., Liu, T. & Zeng, K. Nanoindentation and morphological studies on nylon 66/organoclay nanocomposites. II. Effect of strain rate. *Polymer (Guildf)*. **45**, 8221–8229 (2004).
142. Liu, T., Tjiu, W. C., He, C., Na, S. S. & Chung, T. S. A processing-induced clay dispersion and its effect on the structure and properties of polyamide 6. *Polym. Int.* **53**, 392–399 (2004).
143. Garrido-Miranda, K. A., L Rivas, B. & Pérez, M. A. Poly(3-hydroxybutyrate)-thermoplastic starch-organoclay bionanocomposites: Surface properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **134**, 45217 (2017).
144. HSU, S.-F., WU, T.-M. & LIAO, C.-S. Nonisothermal Crystallization Behavior and Crystalline Structure of Poly(3-hydroxybutyrate)/Layered Double Hydroxide Nanocomposites. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **45**, 995–1002

(2007).

145. Naguib, H. F., Aziz, M. S. A. & Saad, G. R. Effect of Organo-Modified Montmorillonite on Thermal Properties of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate). *Polym. - Plast. Technol. Eng.* **53**, 90–96 (2014).
146. Choudalakis, G. & Gotsis, a. D. Permeability of polymer/clay nanocomposites: A review. *Eur. Polym. J.* **45**, 967–984 (2009).
147. Arora, A. & Padua, G. W. Review: nanocomposites in food packaging. *J. Food Sci.* **75**, R43-9 (2010).
148. Choudalakis, G. & Gotsis, A. D. Permeability of polymer/clay nanocomposites: A review. *Eur. Polym. J.* **45**, 967–984 (2009).
149. Sanchez-Garcia, M. D., Ocio, M. J., Gimenez, E. & Lagaron, J. M. Novel Polycaprolactone Nanocomposites Containing Thymol of Interest in Antimicrobial Film and Coating Applications. *J. Plast. Film Sheeting* **24**, 239–251 (2008).
150. Farmahini-Farahani, M., Khan, A., Lu, P., Bedane, A. H., Eic, M. & Xiao, H. Surface morphological analysis and water vapor barrier properties of modified Cloisite 30B/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composites. *Appl. Clay Sci.* **135**, 27–34 (2017).
151. Hajiraissi, R. & Parvinzadeh, M. Preparation of polybutylene terephthalate/silica nanocomposites by melt compounding: Evaluation of surface properties. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 8443–8450 (2011).
152. Jost, V. & Langowski, H. Effect of different plasticisers on the mechanical and barrier properties of extruded cast PHBV films. *Eur. Polym. J.* **68**, 302–312 (2015).
153. Teymouri, Y. & Nazockdast, H. The effect of process parameters on physical and mechanical properties of commercial low density polyethylene/ORG-MMT nanocomposites. *J. Mater. Sci.* **46**, 6642–6647 (2011).
154. Zaidi, L., Bruzaud, S., Kaci, M., Bourmaud, A., Gautier, N. & Grohens, Y. The effects of gamma irradiation on the morphology and properties of polylactide/Cloisite 30B nanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.* **98**, 348–355 (2013).
155. Wilhelm, H. M., Sierakowski, M. R., Souza, G. P. & Wypych, F. Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydr. Polym.* **52**, 101–110 (2003).
156. Díez-Pascual, A. M. & Díez-Vicente, A. L. ZnO-reinforced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bionanocomposites with antimicrobial

- function for food packaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 9822–34 (2014).
157. Di Maio, E., Iannace, S., Sorrentino, L. & Nicolais, L. Isothermal crystallization in PCL/clay nanocomposites investigated with thermal and rheometric methods. *Polymer (Guildf)*. **45**, 8893–8900 (2004).
  158. Lee, J. H., Park, T. G., Park, H. S., Lee, D. S., Lee, Y. K., Yoon, S. C. & Nam, J. Do. Thermal and mechanical characteristics of poly(L-lactic acid) nanocomposite scaffold. *Biomaterials* **24**, 2773–2778 (2003).
  159. Janigová, I., Lacík, I. & Chodák, I. Thermal degradation of plasticized poly(3-hydroxybutyrate) investigated by DSC. *Polym. Degrad. Stab.* **77**, 35–41 (2002).
  160. Arrieta, M. P., Fortunati, E., Dominici, F. & Ray, E. PLA-PHB / cellulose based films : Mechanical , barrier and disintegration properties. *Polym. Degrad. Stab.* **107**, 139–149 (2014).
  161. Shemesh, R., Krepker, M., Goldman, D., Danin-Poleg, Y., Kashi, Y., Nitzan, N., Vaxman, A. & Segal, E. Antibacterial and antifungal LDPE films for active packaging. *Polym. Adv. Technol.* **26**, 110–116 (2015).
  162. Phoopuritham, B. P., Thongngam, M., Yoksan, R. & Suppakul, P. Antioxidant Properties of Selected Plant Extracts and Application in Packaging as Antioxidant Cellulose-Based Films for Vegetable Oil. *Packag. Technol. Sci.* **25**, 125–136 (2012).
  163. Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Liessi, A. & Callea, A. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. *Food Chem.* **118**, 256–265 (2010).
  164. Van Roon, A., Parsons, J. R., Te Kloetze, A. M. & Govers, H. A. J. Fate and transport of monoterpenes through soils. Part I. Prediction of temperature dependent soil fate model input-parameters. *Chemosphere* **61**, 599–609 (2005).
  165. Cavaleiro, C. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida* , *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1454–1462 (2009).
  166. Lima, I. O., Pereira, F. D. O., Oliveira, W. A. De, Lima, E. D. O., Menezes, E. A., Cunha, F. A. & Diniz, M. D. F. F. M. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J. Essent. Oil Res.* **25**, 138–142 (2013).
  167. Rudnik, E. *Compostable Polymer Materials*. (2008).
  168. Bellia, G., Tosin, M. & Degli-Innocenti, F. Test method of composting in

- vermiculite is unaffected by the priming effect. *Polym. Degrad. Stab.* **69**, 113–120 (2000).
169. Yang, H. S., Yoon, J. S. & Kim, M. N. Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Polym. Degrad. Stab.* **87**, 131–135 (2005).
  170. Fortunati, E., Armentano, I., Iannoni, A., Barbale, M., Zaccheo, S., Scavone, M., Visai, L. & Kenny, J. M. New multifunctional poly(lactide acid) composites: Mechanical, antibacterial, and degradation properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **124**, 87–98 (2012).
  171. Weng, Y. X., Wang, L., Zhang, M., Wang, X. L. & Wang, Y. Z. Biodegradation behavior of P(3HB,4HB)/PLA blends in real soil environments. *Polym. Test.* **32**, 60–70 (2013).
  172. Rosa, D. ., Filho, R. ., Chui, Q. S. ., Calil, M. . & Guedes, C. G. . The biodegradation of poly- $\beta$ -(hydroxybutyrate), poly- $\beta$ -(hydroxybutyrate-co- $\beta$ -valerate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) in compost derived from municipal solid waste. *Eur. Polym. J.* **39**, 233–237 (2003).
  173. Puglia, D., Fortunati, E., D'Amico, D. A., Miri, V., Stoclet, G., Manfredi, L. B., Cyras, V. P. & Kenny, J. M. Influence of Processing Conditions on Morphological, Thermal and Degradative Behavior of Nanocomposites Based on Plasticized Poly(3-hydroxybutyrate) and Organo-Modified Clay. *J. Polym. Environ.* **24**, 12–22 (2016).
  174. Arrieta, M. P., López, J., Hernández, A. & Rayón, E. Ternary PLA-PHB-Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *Eur. Polym. J.* **50**, 255–270 (2014).
  175. Castilho, L. R., Mitchell, D. A. & Freire, D. M. G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* **100**, 5996–6009 (2009).

## CAPÍTULO 6. ANEXO

### 6.1 Publicaciones

Garrido-Miranda, K. A., L Rivas, B. & Pérez, M. A. **Poly(3-hydroxybutyrate)-thermoplastic starch-organoclay bionanocomposites: Surface properties.** *Journal Applied Polymer Science* 134, 45217, 2017.

Garrido-Miranda, K. A.; Rivas, B. L.; Pérez -Rivera, M. A.; Sanfuentes, E. A.; Peña-Farfal, C. **Antioxidant and antifungal effects of eugenol incorporated in bionanocomposites of poly(3-hydroxybutyrate)-thermoplastic starch.** *Food Science and Technology* 98, 260–26, 2018.

### 6.2 Participación en eventos.

**32° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2016 y XXXI Jornadas Chilenas de Química, Concepción, Chile, del 19 al 22 de Enero del 2016.**

Obtención de mezclas de polihidroxibutirato/almidón termoplástico, aplicando diseño de experimento.

Karla A. Garrido-Miranda, Mónica A. Pérez, Bernabé L. Rivas, Víctor H. Campos-Requena.

**XV Simposio Latinoamericano de Polímeros and XIII Congreso Iberoamericano de Polímeros: SLAP, Cancún, México, del 23 al 27 de Octubre del 2016.**

*Obtaining and characterization of Polyhydroxybutyrate/ Thermoplastic Starch Blends.*

Karla Garrido, Mónica Pérez, Bernabé Rivas

**VIII Coloquio de Macromoléculas, Catillo, Chile, del 30 de noviembre al 3 de diciembre del 2016.**

Propiedades mecánicas y térmicas de bionanocompuestos de PHB-Almidón termoplástico/arcilla

Karla A Garrido, Mónica A Pérez, Bernabé L Rivas.

**4th US-Mexico Symposium on Advances in Polymer Science (MACROMEX) and XXX Congreso Nacional de la S.P.M, Los Cabos, Mexico, del 3 al 7 de Diciembre del 2017.**

Antioxidant and antifungal activities of phb-tps/clay/eugenol bionanocomposites films

K. Garrido-Miranda, B.L Rivas, M. Pérez.

**XXXII Jornadas Chilenas de Química, Puerto Varas, Chile, del 9 al 12 de Enero del 2018.**

Efecto del eugenol en las propiedades de los bionanocompuesto de polihidroxibutirato-almidón termoplástico.

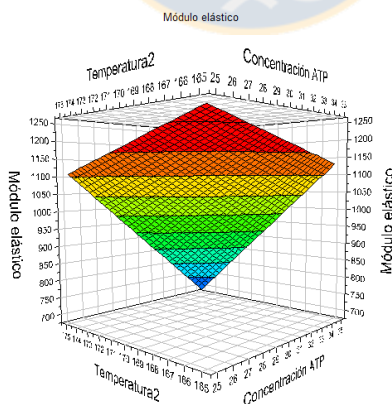
Karla A. Garrido-Miranda, Bernabé L. Rivas, Mónica A.Pérez, Juan P. Fernandez-Blázquez y Miguel Monclús.

## OBTENCIÓN DE MEZCLAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO/ALMIDÓN TERMOPLÁSTICO, APLICANDO DISEÑO DE EXPERIMENTO.

Karla A. Garrido-Miranda, Mónica A. Pérez, Bernabé L. Rivas, Víctor H. Campos-Requena.  
*Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción,  
Casilla 160-C, Concepción, Chile. Email: monicaperez@udec.cl*

Los plásticos han mejorado notablemente la calidad de vida del ser humano, ya que presentan un gran número de aplicaciones. La gran desventaja es la acumulación de sus desechos, debido a su persistencia en el medio ambiente ya que su degradación puede tardar hasta 500 años en muchos de ellos. Por esta razón en los últimos años las investigaciones se enfocan en la producción de materiales biodegradables desde recursos renovables. Entre los materiales biodegradables destaca el polihidroxibutirato (PHB), un polímero biocompatible, producido por bacterias, que se proyecta como posible sustituto del polipropileno. Los inconvenientes por los que aún no impacta en el mercado son su alta fragilidad, alto precio, y su corto rango entre la temperatura de fusión y la temperatura de descomposición.<sup>1</sup>

En la presente investigación se realizó un estudio aplicando diseño de experimento (DoE), para analizar el efecto de cuatro variables<sup>2</sup> del proceso de obtención de mezclas de PHB y almidón termoplástico (ATP) en una extrusora de doble husillo: temperatura de mezclado en dos zonas de la extrusora (1 y 2), velocidad de mezclado y concentración de (ATP), sobre el módulo elástico de estas mezclas de PHB/ATP. Tras un DoE factorial completo 2<sup>4</sup> se determinó que solo existe interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre la concentración de ATP y la temperatura de mezcla 2. La velocidad de mezcla es una variable no significativa ( $p > 0,05$ ) sobre el módulo elástico y solo las temperaturas de mezclas y la concentración ATP tienen un efecto directo sobre la respuesta estudiada (Fig.1).



**Figura 1.** Mapa de superficie de respuesta 3D, graficando el efecto de la temperatura de mezcla 2 y la concentración de ATP, sobre el módulo elástico. Temperatura de mezcla 1 a 130°C.

### Referencias

1. M. Zhang and, N. Thomas, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2009, **116**, 688–694.
2. V. H. Campos-Requena, B. L. Rivas, M. A. Pérez and M. Wilhelm, *Polym. Bull.*, 2014, **71**, 1961–1982

## Obtaining and characterization of Polyhydroxybutyrate/ Thermoplastic Starch Blends.

Karla Garrido <sup>1</sup>, Mónica Pérez <sup>1</sup>, Bernabé Rivas <sup>1</sup>

1. Universidad de Concepción, Edmundo Larenas 129, 4030000, Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas, Concepción, Chile karlagarrido@udec.cl

### Introduction

Biodegradable polymers are being researched those could replace synthetic polymers such as polyethylene, polypropylene and polyethylene terephthalate, in applications of short periods of time (packaging, medical supplies, agriculture, etc.).<sup>1</sup> Among different biodegradable polymers it is found polyhydroxybutyrate (PHB), which has a melting point between 170-180°C and high rigidity<sup>175</sup>. The reason why they have not replaced synthetic polymers yet, it's because it has some drawbacks in its thermal properties (poor thermal stability) and mechanical properties (high brittleness). One way to counter these disadvantages is by obtaining of PHB / thermoplastic starch blends, because starch helps reduce stiffness and increase its processing window.

### Experimental Part

The blending PHB/Starch were obtained by melt blending using a co-rotating twin-screw extruder, with L/D ratio of 16 mm, using a temperature profile of 100, 150, 165, 170°C and a screw speed set at 100 rpm. It worked with concentration of thermoplastic starch 25 and 35 % wt/wt.

The blends were characterized by X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and mechanical properties (Tensile properties were evaluated according to ASTM D 638).

### Results and Discussions

The results obtained of the blends by FT-IR showed the characteristic peaks of biopolymers, a strong peak at 1700 cm<sup>-1</sup>, attributed to vibrations of the carbonyl groups of the PHB and a peak corresponding to the band of the hydroxyl group (at 3400 cm<sup>-1</sup>) of the starch, also showed a slight decrease in intensity these peak, this could be attributed to the existence of weak interactions (hydrogen bonds) between the PHB and TPS. Figure 1 shows the Young's modulus for the blends with 25 and 35% wt / wt of TPS, this reflects that higher content of TPS is less the Young's modulus, which is attributable to the TPS is a more flexible polymer.

The results of the thermal properties are shown in Table 1 (the melting temperatures and enthalpies were obtained from the second heating). The PHB / TPS blends show two melting temperatures, these two melting peaks which are attributed to recrystallization or two different lamella thickening.<sup>2</sup> The decomposition temperature showed increases with respect the PHB. Improvement in the thermal stability is thought to be due to the hydrogen bonds that form between TPS and PHB as these may inhibit the formation of the six-membered ring<sup>3</sup> which is the primary

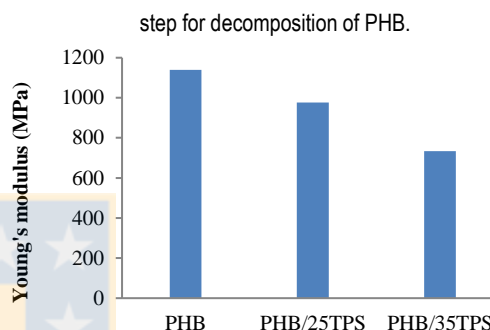


Figure 1. Effect of TPS content on young modulus of TPS/PHB blends.

Table 1. DSC and TGA data of PHB/TPS blends and PHB.

Content of TPS (% wt/wt)	Td (°C)	Tm <sub>1</sub> (°C)	Tm <sub>2</sub> (°C)	Crystallinity* (%)
25	301,4	151,5	159,2	53,9
35	303,3	154,2	160,2	57,1
0	287,6		163,2	54,2

\*The degree of crystallinity was calculated by the following relation<sup>19</sup>:  

$$\chi_{PHB} = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100\% PHB}} \cdot 100$$
 where  $\Delta H_{100\%}=146$  J/g and  $\chi_{PHB}$  is the polymer weight fraction (PHB) in the sample.

### Conclusions

With the obtaining the blends PHB-TPS were prepared by melt compounding. The thermal properties showed that increased the processing window compared to PHB, as the result of the reduction in melting temperature and the decomposition temperature increase. Also the results indicate that blending of PHB with thermoplastic starch allow obtaining more flexible materials according to the content of TPS.

**Acknowledgment:** Beca CONICYT N°21161368 and CIPA (Centro de Investigación de Polímeros Avanzados).

### References

- 1 S. Chanprateep, J. Biosci. Bioeng., 2010, 110, 621–632.
- 2 L. R. Castilho, D. A. Mitchell and D. M. G. Freire, Bioresour. Technol., 2009, 100, 5996–6009.
- 3 M. a. Abdelwahab, A. Flynn, B.-S. Chiou, S. Imam, W. Orts and E. Chiellini, Polym. Degrad. Stab., 2012, 97, 1822–1828.
- 4 M. Zhang and N. L. Thomas, J. Appl. Polym. Sci., 2009, 116, 688–694.





## Propiedades mecánicas y térmicas de bionanocompuestos de PHB-Almidón termoplástico/arcilla

Karla A Garrido, Mónica A Pérez, Bernabé L Rivas.

Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Chile, karlagarrido@udec.cl

El polihidroxitirato (PHB) es un polímero natural y biodegradable, posee propiedades similares a polímeros sintéticos que son ampliamente utilizados actualmente, como el polipropileno o el caucho sintético.<sup>1</sup> Sin embargo, su aplicación en la industria se ve limitada, ya que posee algunas desventajas (alta fragilidad, estrecha ventana de procesamiento y su alto costo). Una buena alternativa para contrarrestar sus desventajas es la obtención de bionanocompuesto de PHB-almidón termoplástico (ATP)/arcilla.

En la presente investigación se obtuvo bionanocompuesto de PHB- ATP con una arcilla montmorillonita por mezclado en estado fundido a 175°C. Los bionanocompuestos fueron caracterizados por difracción de rayos X (DRX), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), Microscopía electrónica de barrido (SEM), Calorimetría diferencial de barrido (DSC), Análisis termogravimétrico (TGA) y nanoindentación. En los resultados obtenidos por AFM se mostró que los bionanocompuestos presentan una rugosidad superficial 30,88 nm comparada con la del PHB procesado que es de 14,53 nm, estos resultados están asociados a la migración de las capas de arcilla hacia la superficie. Los resultados de DRX mostraron que las capas de arcilla se encontraban totalmente dispersadas, lo que correspondería a una morfología exfoliada del bionanocompuesto. La dureza y el módulo elástico de los bionanocompuestos presentan valores similares a los del PHB logrando mejorar las desventajas que presenta la mezcla de polímeros PHB-ATP. Las propiedades térmicas no presentan cambios significativos, solo el grado de cristalinidad presenta una disminución con el aumento del contenido de arcilla. Estos resultados muestran que con la obtención de bionanocompuesto se mantienen y mejoran las propiedades del PHB, además de que las mezclas son una buena alternativa para reducir el coste de los productos.

Tabla 1. Resumen de propiedades térmicas y mecánicas de la mezcla PHB-ATP y de los bionanocompuesto PHB-ATP con 1 y 5% m/m de arcilla.

Muestra	Dureza (Mpa)	Módulo elástico (GPa)	Rugosidad superficial (nm)	Tm <sub>1</sub> [°C]	Tm <sub>2</sub> [°C]	Td (°C)	Grado de cristalinidad (%)
PHB	139,8±14,5	3,14±0,49	14,53±6,75	163,2		296,7	54,2
PHB-ATP (65:35)	112,6±11,6	2,54±0,49	12,60±0,028	151,5	160,0	300,1	34,4
PHB-ATP/1OMMT	133,7±22,4	2,64±0,38	17,77±0,92	159,6	168,1	299,5	33,4
PHB-ATP/5OMMT	136,2±26,0	3,09±0,71	30,88±5,88	155,4	164,2	298,3	30,3

**Agradecimientos:** Beca CONICYT de doctorado, Dirección de Postgrado de universidad de concepción, al Dr. Cristian Nuñez (Universidad del Bío Bío) y la Dra. Raquel Mauler de la Universidad federal de Rio Grande Do Sol.

1. Reis, K. C., Pereira, J., Smith, A. C., Carvalho, C. W. P., Wellner, N. & Yakimets, I. *Journal Food Engineering*. 89, 361–369 (2008).



## ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF PHB-TPS/CLAY/EUGENOL BIONANOCOMPOSITES FILMS

K. Garrido-Miranda<sup>1</sup>, B.L Rivas<sup>1</sup>, M. Pérez<sup>1</sup>

Faculty of Chemistry, University of Concepción, Concepción, Chile

Corresponding author's email: [Karlagarrido@udec.cl](mailto:Karlagarrido@udec.cl)

The packaging industry is that contributes with the most amount of waste since its use is limited to a short period of time,<sup>1</sup> for this reason It is becoming increasingly important to use biodegradable materials that helps to reduce the packaging industry residues, and also to satisfy the need of the consumers of a packaging that can extend shelf-life of food. Therefore, it was determined obtain Polyhydroxybutyrate (PHB)- thermoplastic starch (TPS)/Clay (organically modified montmorillonite)/Eugenol bionanocomposites as an alternative to traditional materials,<sup>2</sup> where Eugenol is the major component of clove oil, PHB and TPS are biodegradable polymers.

PHB-TPS/Clay/Eugenol bionanocomposites were obtained by melt blending using a co-rotating twin-screw extruder. The bionanocomposites were tested for antifungal activity against *botrytis cinerea* and the antioxidant activity were assessed via the DPPH radical scavenging activity (%) according to Eq (1), where Abs<sub>control</sub> is the absorbance of the control (PHB). Also, morphological, thermal and mechanical properties were determined.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

PHB-TPS/Clay/Eugenol bionanocomposites showed microbial inhibition zones against the *botrytis cinerea*. The films without eugenol did not show clear inhibition zones for fungi, reflecting no antifungal activity for this material. DPPH radical scavenging activity was approximately 92% for bionanocomposites with eugenol. This suggests that the bionanocomposites have a strong antioxidant activity, releasing an amount of eugenol high enough to scavenge DPPH. The mechanical and thermal properties did not present changes significant with respect to the PHB. In conclusion, Bionanocomposites with eugenol (3 wt%) could be used for prolong the shelf life of food.

**Keywords:** bionanocomposites, Antifungal activities, Antioxidant activities.

### References:

1. Marsh, K.; Bugusu, B. J. Food Sci. 2007, 72, R39-55.
2. Garrido-Miranda, K. A.; L Rivas, B.; Pérez, M. A. J. Appl. Polym. Sci. 2017, 134, 45217

**Acknowledges:** CONICYT for the PhD scholarship national N° 21161368, Postgraduate School of University of Concepción and Professor Eugenio A. Sanfuentes of the faculty of forestry, University of Concepción.

## Efecto del eugenol en las propiedades de los bionanocompuesto de polihidroxitirato-almidón termoplástico.

Karla A. Garrido-Miranda,<sup>a</sup> Bernabé L. Rivas,<sup>a</sup> Mónica A. Pérez,<sup>a</sup> Juan P. Fernández-Blázquez<sup>b</sup> y Miguel Monclús.<sup>b</sup>

Universidad de Concepción, Casilla 160–C, Concepción, Chile. [karlagarrido@udec.cl](mailto:karlagarrido@udec.cl)  
Instituto IMDEA Materiales, c/Kendal 28906 Getafe, España.

Como una alternativa a los materiales para envase tradicionales se están desarrollando materiales con capacidad antioxidante y antimicrobiana en matrices biodegradables con el fin de contrarrestar el nivel de contaminación por plástico y retrasar el deterioro de los alimentos. Para este fin se están utilizando aceites esenciales como timol, carvacrol y eugenol en bionanocompuestos con arcilla, ya que estos mejoran las propiedades de la mezcla polímeros biodegradables<sup>1</sup> y además se ha comprobado de que la arcilla evita la rápida liberación de los aceites esenciales.<sup>2</sup>

Los bionanocompuestos de polihidroxitirato (PHB)-almidón termoplástico (ATP)/ arcilla (3%)/eugenol (2,5%) fueron obtenidos por mezclado en estado fundido. Se analizó el efecto del eugenol en las propiedades morfológicas, mecánicas y térmicas del bionanocompuesto mediante técnicas como Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Análisis Térmico Dinámico-Mecánico (DMTA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), además se analizó su capacidad antioxidante mediante el porcentaje de eliminación de radicales DPPH.

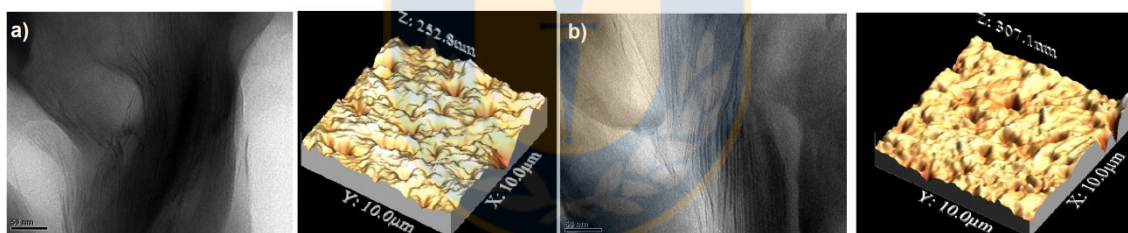


Figura 1. Microfotografías TEM e imágenes topográficas 3D de AFM para a) bionanocompuesto PHB-ATP/Arcilla (3%) y b) bionanocompuesto PHB-ATP/Arcilla (3%)/Eugenol (2,5%).

Las microfotografías TEM mostraron una morfología combinada intercalada-exfoliada para los bionanocompuestos, en las imágenes topográficas de AFM no se observó diferencia entre el bionanocompuesto con y sin eugenol, por lo que la rugosidad promedio no presentó cambios significativos entre ellos. Por DMTA se observó que el eugenol disminuyó el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) y la  $T_g$ , lo que podría atribuirse a que el eugenol interfiere en las interacciones entre la arcilla y el polímero. Por DSC se obtuvo una disminución en la temperatura de fusión y la temperatura de cristalización de los bionanocompuesto y el grado de cristalinidad aumento con respecto al del PHB. Finalmente, los bionanocompuesto con eugenol presentaron un 92% de inhibición para radicales DPPH y los bionanocompuestos sin eugenol un 2% de inhibición.

**Agradecimientos:** Beca CONICYT de doctorado nacional N°21161368, Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción y al Instituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA) materiales.

### Referencias

- (1) Garrido-Miranda, K. A.; L Rivas, B.; Pérez, M. A. J. Appl. Polym. Sci. 2017, 134 (34), 45217.
- (2) Campos-Requena, V.; Rivas, B.; Pérez, M.; Garrido-Miranda, K.; Pereira, E. Eur. Polym. J. 2015, 71, 461-475.