

## RESUMEN

Con el objetivo de obtener plásticos biodegradables a base de polisacáridos naturales y polímeros sintéticos, se prepararon un total de 10 formulaciones para elaborar membranas plásticas por el método de extrusión. Se clasificaron en 5 grupos dependiendo de los polisacáridos que contenían: Grupo 1 (Almidón), Grupo 2 (Quitina), Grupo 3 (Pululan), Grupo 4 (Pectina), y Grupo 5 (controles, a base de 100% PEBD y 100% de EAA, respectivamente). El contenido de polisacárido en estas membranas fue de 40%. Las propiedades físico-mecánicas de % de elongación y fuerza de tensión de estas membranas, no fueron comparables con los controles; obteniéndose membranas poco flexibles y débiles para el grupo de almidón, suaves y débiles para quitina y duras y quebradizas para pectina. El polietilenglicol adicionado como plastificante el cual es biodegradable, incrementó ligeramente el % de elongación en aquellas formulaciones que lo presentaron. Sin embargo la biodegradabilidad de las membranas no se vió afectada por la presencia de este compuesto. Las pruebas de biodegradabilidad se realizaron en tres sistemas: laboratorio, río y en suelo (2 diferentes fechas), midiéndose por diferentes técnicas como pérdida en peso, espectroscopia de infrarrojo, microscopia electrónica de barrido y resonancia magnética nuclear. Los resultados en laboratorio tanto para el consorcio LD-76 como para *Serratia marcescens*, mostraron que los formulados del grupo de pectina (4), presentaron la mayor pérdida en peso con 44.26% para el formulado 5 y 42.71 % para el formulado 8, a los 45 días de exposición con LD-76; 72.86% y 65.94% para F5 y F8, respectivamente, con *Serratia marcescens*. Los resultados de río, también indicaron que el grupo de pectina fue el que presentó la mayor pérdida en peso con 71.92% para F8 y 67.25% para F5, a los 62 días de exposición. En los experimentos de suelo el análisis estadístico indicó que el formulado 3 del grupo de quitina (2), presentó la mayor diferencia de peso promedio durante el experimento del período Enero-Mayo'94. Para el grupo 5 correspondiente a los controles, no se observó pérdida en peso en ninguno de los ecosistemas probados. Se encontró alta diferencia significativa entre los formulados con respecto a este parámetro en los ecosistemas probados. Se observó que la adhesión de los microorganismos a las membranas no fue un requisito para que se presentara pérdida en peso. En cuanto a las propiedades físico-mecánicas de las membranas después de exponerse a los diferentes ecosistemas, generalmente el % de elongación disminuyó y la fuerza de tensión se incrementó para ciertos formulados mientras que en otros este parámetro disminuyó. Finalmente los análisis de espectrofotometría de infrarrojo mostraron la disminución en la absorción en las bandas características de los grupos C-O y OH presentes en las membranas con almidón, así como en las bandas correspondientes a los grupos COOH para las membranas que contenían pululan o pectina además del almidón, y en la banda del grupo amida I para aquellas que contenían quitina, no encontrándose disminución en las bandas de absorción de los grupos C-H y C=O, correspondientes a los polímeros sintéticos. Los estudios de resonancia magnética nuclear realizados a un formulado representativo de cada grupo corroboraron los resultados de pérdida en peso y de espectrofotometría de infrarrojo, en donde la membrana del grupo de pectina perdió 86.38%, del 40% de carbohidrato que contenían todas las formulaciones; la membrana del grupo de quitina perdió 86.25% y la de almidón 80%, durante el experimento de río.

## ABSTRACT

Biodegradable plastics matrices were developed by blending synthetic polymers with polysaccharides from renewable resources. A total of 10 formulations ( F1, F2,...F10) were prepared, and thin plastics films were obtained using extrusion methods. Based on the type of polysaccharide they contained, films were placed into five groups; starch, chitin, pullulan, pectin, and controls containing synthetic polymers without any polysaccharide. The polysaccharide content in films were about 40%. Incorporation of polysaccharide generally affected the mechanical properties, namely, % elongation and tensile strength of the films. The effect varied somewhat depending on the type of polysaccharide used in the films. The addition of polyethylene glycol, a biodegradable plasticizer slightly increased the % elongation of the films. The biodegradability of each film was examined by exposing samples to the laboratory cultures (LD-76 a consortium of highly amylolytic bacteria and cultures of *Serratia marcescens*) and in natural environments such as river and soil. The biodegradation was measured by the loss of tensile properties and weight of films within a period of time, and by measuring the loss of biopolymers in each formulation using FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and SEM (Scanning Electron Microscopy). The film containing pectin, both formulations F5 and F8 suffered the greatest weight loss ranging from 42.71% -72.86% upon exposure to microbial cultures for 45 days. The weight loss was always higher in formulation F5 incubated with *Serratia marcescens*. A similar trend was observed in the river where pectin film formulation F5 and F8 lost 71.92 and 67.25% weight respectively, in 62 days. In soil experiments, however, films containing chitin (F3) showed significantly more weight loss compared to the others polysaccharide films. Additionally, the weight loss was more pronounced during the months of January-May 1994. The control films containing either pure polyethylene or ethylene-co-acrylic acid did not lose weight in any ecosystem studied. It was further observed that the adherence of microorganisms to the plastic surface was not necessary for film degradation. Consistent with the weight loss data, FTIR spectroscopy revealed loss of absorbance bands characteristic of polysaccharides in the films. These include, for example, by C-O and OH groups in starch, COOH group in films with pullulan or pectin with starch, and amide I region for films with chitin. The C-H and C=O bands contributed by the synthetic polymers remained unchanged, indicating no degradation. The NMR evaluation of the representative sample for each polysaccharide film confirmed the weight loss and FTIR results, indicating that from 40% of polysaccharide content in the films exposed in the river, the calculated loss for individual polysaccharide was 86.38% for pectin, 86.25% for chitin and 80% for starch, respectively.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la humanidad a través de los avances tecnológicos, ha traído por consecuencia efectos negativos sobre la misma como la escasez de recursos no renovables y la contaminación del medio ambiente, entre otros. Sobre este último, uno de los problemas es el incremento de la basura producida por los diferentes tipos de desechos como consecuencia de los altos niveles de vida que el hombre ha alcanzado. La persistencia en el ambiente de productos a base de petroquímicos, específicamente los plásticos, es una gran problemática de la sociedad moderna.

Una vez utilizados los plásticos, los desechos de estos representan un contaminante en muchos ecosistemas, suelos, lagos y océanos. En estos últimos, existen reportes de diversos daños y muertes en animales como aves y mamíferos marinos, estimándose que un 30% de los peces en los océanos del mundo tienen pedazos de plástico en su estómago, el cual interfiere con su digestión (Bade y Wick, 1988; Breslin y Swanson, 1993; Andrady *et al*, 1993).

Por otro lado, durante las últimas décadas ha habido un continuo incremento en la elaboración de productos a base de plásticos utilizados principalmente para el empaque de diversos productos (en 1988, cerca del 30% de las 51 billones de libras de plástico producidas en EUA, se utilizaron para este fin). Esto ha traído como consecuencia un incremento inherente en la cantidad de desechos plásticos, los cuales afectan la composición en la relación volumen:peso de la basura (Huang *et al*, 1995; Corti *et al*, 1991).

La problemática que se plantea, es la elevada producción de plásticos en sus diversas formas debido a la alta demanda y acumulación de estos productos en el medio ambiente. Se podría decir que los factores que han originado el estudio de esta problemática son el incremento en los precios y la disminución en los abastos de petróleo, aunado a las necesidades de productos mas aceptables desde un punto de vista ambiental.

Entre las soluciones propuestas para reducir el impacto ambiental de los desperdicios plásticos se incluyen: la reducción de su uso, el reciclaje, la incineración, el composteo y la degradación ambiental. Esta última se refiere a la fotodegradación o ataque por radiaciones ultravioleta y a la biodegradación o ataque por microorganismos (Huang *et al*, 1995; Iannotti *et al*, 1990).

Sobre este último punto las investigaciones se han abocado a la búsqueda de materiales que presenten las principales características de los plásticos pero que no sean dañinos al ambiente, así es como surgen los llamados “plásticos biodegradables”.

La introducción de polímeros naturales dentro de matrices poliméricas sintéticas y el procesamiento de estas para dar como producto final un plástico, fueron las bases del desarrollo de los plásticos biodegradables.

Investigaciones realizadas principalmente en EUA, llevaron a la elaboración de diversas formulaciones a base de polímeros sintéticos y almidón como componente biodegradable. Para EUA, el almidón es un producto agrícola barato (10¢ /libra) (Swanson *et al*, 1993); el uso de esta materia prima, además de contribuir a la disminución de los problemas de contaminación causada por los plásticos sintéticos, podría reducir en el futuro

la necesidad de importación de petróleo por este país o permitir conservar este recurso no renovable para otros usos (Pennisi, 1993).

El almidón fue utilizado debido a sus propiedades fisicoquímicas y a la sobreproducción de maíz que se presentó en la década de los 70's en EUA. Sin embargo, existen otros polisacáridos naturales relacionados con el almidón que presentan un potencial para la elaboración de estos productos debido a su naturaleza química y biológica, como ejemplo se encuentran la celulosa, lignina, pectina, pululan y quitina; polisacáridos que en algunos casos son considerados contaminantes por su acumulación en el ambiente, ya que no se les ha dado un uso práctico (Murray y Hattis, 1978).

La celulosa es el polisacárido principal de muchos materiales en diversas industrias como papel, y fibras de origen vegetal. Tanto el almidón como la celulosa son polímeros con la misma unidad constitutiva, glucosa; sin embargo las peculiaridades individuales de las dos moléculas permiten un ataque microbiano más fácil hacia la primera mientras que la otra es más resistente a la descomposición microbiana y enzimática, además de estimular poblaciones completamente diferentes (Koch y Röper, 1988).

En el caso de la lignina, es un compuesto complejo de unidades aromáticas que se encuentra en la pared celular de algunos vegetales en íntima relación con la celulosa, su variabilidad estructural le confiere una velocidad de degradación más lenta que la celulosa en la naturaleza y aunque existen microorganismos capaces de utilizarla sus características físicas no aseguran su capacidad de incorporación dentro de matrices plásticas.

Por otro lado, la quitina es un polisacárido cuya unidad básica es un aminoazúcar

que proporciona la fuerza mecánica en los organismos que la poseen. Este compuesto es similar a la celulosa reemplazado por una unidad de acetilamina. El alto potencial de los polímeros de quitina para numerosas aplicaciones ha recibido poco reconocimiento, sin embargo actualmente el interés en este compuesto se ha incrementado. Dentro de los usos potenciales se ha estudiado como suplemento alimenticio, purificador de desechos industriales, recuperación de proteínas, reductor de colesterol, acelerador de crecimiento en plantas y en la elaboración de membranas biodegradables (Knorr, 1991).

El pululan es un polímero lineal compuesto de unidades de maltotriosa entrelazadas por enlaces alfa 1,6; este polímero se encuentra en las cápsulas del hongo *Aurobasidium pullulans* y algunos otros microorganismos y es producido como un metabolito secundario (Mayer *et al*, 1990). Son pocos los trabajos realizados acerca de las posibles aplicaciones de este polisacárido, sin embargo su estructura química lo propone como un buen candidato en la elaboración de compuestos biodegradables.

En el caso de la pectina, su estructura química consiste en cadenas largas y complejas principalmente en la forma de unidades de ácido poligalacturónico. Es uno de los polisacáridos más importantes usado en la industria alimentaria, es extraída de los desechos sólidos que provienen principalmente de la industria juguera, tales como el bagazo de manzana y cáscara de frutos cítricos, específicamente el limón. Desde un punto de vista económico y debido a la gran diversidad de usos actuales y potenciales de la pectina, su mercado es sumamente amplio, sobre todo aquí en México donde contamos con frutos de poca explotación comercial y cuyo contenido de pectina son comparables con los del limón (Monroy *et al*, 1990).

## **IMPORTANCIA**

El impacto ecológico que tendría la fabricación y utilización de plásticos biodegradables a base de polisacáridos sería de gran beneficio para disminuir los problemas de contaminación, ya que se estima que los plásticos recalcitrantes se acumulan en el medio ambiente a una velocidad de 25 millones de toneladas por año y aunque no se conoce el tiempo requerido por estos compuestos para su total mineralización a  $\text{CO}_2$ , se supone que el uso de plásticos biodegradables disminuiría la contaminación por estos productos en un 20%. Por otro lado, la demanda de petróleo por el sector industrial que elabora estos productos disminuiría sobre todo para aquellos países cuya situación geográfica los obliga a importar este recurso no renovable.

Además, una reducción en el volumen del componente plástico en los desperdicios sólidos municipales, puede promover la capacidad adicional en dichos basureros para el manejo de otro tipo de desperdicios. Por último, la explotación del potencial que brindan materias primas de origen natural como la pectina, pululan o quitina para la elaboración de plásticos biodegradables, crea una perspectiva al manejo de este tipo de materiales, los cuales son abundantes en nuestro país y cuya aplicación no está totalmente explotada.

La mayoría de los polímeros que se encuentran en el mercado se sintetizaron debido a la demanda de productos con propiedades nuevas y mejoradas. Los métodos para obtener nuevos polímeros y mezclas, así como la investigación sobre sus estructuras y propiedades originan temas de estudio muy interesantes, pero el uso de estos materiales en productos comerciales constituye la fuerza motriz de estos avances.

**El presente trabajo está dirigido a la elaboración de materiales biodegradables a partir de recursos naturales renovables, que presenten características plásticas.**

**De los polisacáridos seleccionados para el desarrollo de este trabajo el almidón es el único que ha sido ampliamente utilizado y pocos reportes existen sobre el uso de pululan y quitosan para elaborar membranas; sin embargo, no existen reportes sobre el uso de pectina y tampoco sobre el uso de mezclas de almidón con estos polisacáridos para la elaboración de plásticos biodegradables. Por lo tanto la originalidad del presente trabajo radica en la integración de estas mezclas para elaborar membranas biodegradables.**

**En base a esta problemática antes planteada se propuso la siguiente hipótesis y los siguientes objetivos para el presente trabajo:**



## **HIPÓTESIS**

**“Es posible formular plásticos biodegradables a partir de al menos uno de los siguientes polisacáridos: quitina, pectina, pululan, mezclados con almidón y polímeros sintéticos como PEBD y EAA, los cuales presentarán susceptibilidad de biodegradación”.**

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

**- Evaluar el potencial de polisacáridos naturales como quitina, pectina y pululan para elaborar plásticos biodegradables al mezclarse con almidón y polímeros sintéticos como PEBD y EAA.**

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Elaborar diversas formulaciones de plásticos biodegradables a partir de almidón-( quitina, pectina, pululan ) utilizando el método semiseco de Otey.**
- Probar la biodegradabilidad de los plásticos elaborados en el punto anterior a nivel de laboratorio utilizando microorganismos específicos.**
- Probar la biodegradabilidad de las membranas plásticas elaboradas, a nivel de campo (río y suelo).**

## **ANTECEDENTES**

### **QUE SON LOS PLÁSTICOS.-**

Podemos definir a un plástico como aquel material que se fabrica a partir de un polímero (obtenido del petróleo), por lo general haciéndolo fluir bajo presión (Wittcoff y Reuben, 1985; 1987).

Los plásticos son típicamente ligeros y químicamente inertes y pueden ser fabricados para ser rígidos, flexibles e impermeables. Como resultado de estas características, los plásticos han reemplazado al papel, vidrio y metal en muchas aplicaciones; además, estos tienen una larga vida y son resistentes a la degradación en ambientes naturales (Breslin, 1993).

### **POLÍMEROS ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y APLICACIONES.-**

Los polímeros se producen por la unión de cientos o miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman enormes cadenas de las formas mas diversas. Los materiales como el polietileno, el policloruro de vinilo (PVC), el polipropileno y otros que contienen una sola unidad estructural, se llaman homopolímeros. Los copolímeros como el copolímero de etileno y ácido acrílico, contienen varias unidades estructurales. Estas combinaciones de monómeros se realizan para modificar las propiedades de los polímeros y lograr nuevas aplicaciones. Los polimeros contienen dos regiones una cristalina y otra

amorfa, en la región cristalina, las cadenas están dobladas varias veces en zigzag y alineadas formando las regiones llamadas cristalitos; en las amorfas, las cadenas se enmarañan sin presentar un ordenamiento.

La copolimerización en general destruye la regularidad estructural y baja el grado de cristalinidad. Se usa industrialmente para reducir la temperatura de fusión de poliésteres y poliamidas que se usan en adhesivos de fusión en caliente.

Los plastificantes son sustancias que se agregan a los polímeros para impartirles mayor flexibilidad. Los más comunes son los ftalatos. Si se incorpora un plastificante a un polímero cristalino, se reduce su cristalinidad, se vuelve más flexible y se reblandece a menor temperatura. El plastificante actúa como un separador de cadenas de los polímeros (Barrón, 1989).

El polietileno es el polímero de mayor importancia comercial y esto se atribuye a:

- Su bajo costo, por lo barato de la materia prima y el alto nivel de producción.
- Su baja polaridad, que lo hace tener excelentes propiedades eléctricas.
- La facilidad de su procesamiento por técnicas muy variadas.
- Sus aceptables propiedades mecánicas.
- Su baja absorción de humedad.

Existen tres clases de polietileno básicamente:

El de alta densidad, el de baja densidad y el lineal de baja densidad.

Los dos primeros son homopolímeros y el último es un copolímero del etileno con otros monómeros.

**-El polietileno de baja densidad:**

Este término incluye a los polietilenos ramificados con densidades de 0.91 a 0.93, grados de cristalinidad de 50 a 70 % y temperaturas de fusión entre 100 y 110° C.

Las aplicaciones mas importantes de los polietilenos de baja densidad son:

-55% se procesa en forma de películas principalmente bolsas y empaques para alimentos, para usos agrícolas como acolchado, cubiertas para invernadero, así como para impermeabilizar canales y depósitos de agua.

-10 a 15% se ocupa para hacer una gran variedad de artículos moldeados

-15 a 20% se usa para aislar cables y alambres eléctricos.

- el resto se extrae para laminarlo con papel, cartón, hojas metálicas o se coextruye con otros plásticos.

**-Copolímeros de Etileno:**

Copolímero de etileno con ácido acrílico (EAA):

Para reducir la demanda de materiales con buena adherencia a los metales se han desarrollado los ionómeros, es decir copolímeros del etileno con ácido acrílico. Lo que les imparte la propiedad de adhesividad es la porción de ácido acrílico; la resistencia química y térmica de estos productos, es ligeramente inferior a la de los homopolímeros del etileno.

**Las aplicaciones del copolímero de etileno:**

**-Aislamiento de cables**

**-Recubrimiento de tubería de acero**

**-Coextrusión de películas**

**-Películas para empaque**

**-Sellos plásticos para bebidas**

**-Mezclas de polímeros: Los polietilenos son incompatibles con polímeros polares, como son la mayoría, el problema se resuelve empleando copolímeros de EAA.**

**-Espumas**

**-adhesivos de fusión en caliente (Barrón, 1989).**

## **PRODUCCIÓN Y PROBLEMÁTICA DE LOS PLÁSTICOS.-**

Los plásticos recalcitrantes se acumulan en el medio ambiente a una velocidad de 25 millones de toneladas al año; se ha reportado que la mayoría de los plásticos permanecen más o menos sin cambio en los basureros hasta por dos décadas, esto debido a su alto peso molecular, estabilidad química y su relativamente bajo radio de área de superficie:volumen que lo hacen menos factible al ataque microbiano (Lee *et al*, 1991).

Durante 1987, en EUA el sector agrícola utilizó 125 billones de libras de polietileno por año aproximadamente, destinadas para cubiertas de cultivos en cosechas de alto valor como vegetales, frutas y flores; ya que la cubierta no puede reutilizarse y no es degradable,

debe ser removida y desechada a un costo de 100 dls. por acre aproximadamente (Swanson *et al*, 1987).

Para 1988 en E.U.A. los plásticos comprendieron cerca del 8% en peso dentro del total de los desperdicios municipales y ocuparon un 18% del volumen de estos desperdicios sólidos en los basureros (Breslin, 1993).

En Estados Unidos los desechos sólidos municipales alcanzan un promedio anual de 160 millones de toneladas métricas (U.S., EPA, 1988) y aunque los plásticos consisten en el 7-11% en peso la baja densidad de estos productos origina que ocupen de un 25 a un 30% del volumen de los desechos sólidos municipales (Andrady *et al*, 1993).

En Europa Occidental, los desechos plásticos representan solo del 15 al 20 % del total de los desperdicios, y los plásticos utilizados para empaque son la fuente de solo el 30 al 40 % del volumen total de los desperdicios plásticos. Los plásticos mas utilizados son polietileno (ca 60%), polipropileno (ca. 13%), poliestireno (ca. 10%), PVC (ca. 10%) y PET (ca. 5%). La incompatibilidad entre estos diversos polímeros es una fuente de muchos problemas para su posible reciclaje.

La composición promedio de los desperdicios municipales en Europa es: papel y cartón 25%, vidrio 10%, plásticos 7%, desechos orgánicos 30%, metales 8%, textiles 10%, varios 10%. Los posibles sitios para rellenos sanitarios están saturados y es cada vez mas difícil abrir nuevos lugares. Las soluciones que ellos han propuesto son: reducir el uso de plásticos para empaque, promover materiales reciclables y recuperación de energía por incineración, usar materiales degradables y esencialmente biodegradables como papel o nuevos plásticos desarrollados (Breant y Aitken, 1990).

En Estados Unidos de Norteamérica, el método más común para el manejo de desechos son los rellenos sanitarios (95%) y la incineración (5%). En Japón, 70% de la basura es incinerada. En Europa Occidental, más del 50% es incinerada con la finalidad de utilizar la energía calórica generada, sobre todo de los plásticos (Johnson, 1987).

Los requerimientos específicos de operación en los rellenos sanitarios, consideran que la mejor velocidad de degradación para plásticos utilizados para empacar es de dos años. Dentro de este marco de tiempo, tales materiales podrían perder su integridad para hacerse porosos y quebradizos.

Para la Industria del Plástico en EUA, la producción anual de plásticos podría crecer de 55 billones de toneladas anuales a 76 billones para fines del presente siglo. Más de un millón de aves marinas y aproximadamente 100,000 mamíferos marinos mueren cada año por ingestión de plásticos o por estrangulamiento con desechos de los mismos (Wirka, 1988).

El daño económico que los plásticos representan para la industria turística, específicamente en playas, es también considerable. En un estudio de campo que implicó 3 horas de limpieza de una extensión de 157 millas de playa en Texas en 1987, se colectaron 31,773 bolsas de plástico, 30,295 botellas de plástico, 15,631 anillos para six-pack, 28,540 tapas, 1914 pañales desechables y 7460 botes para leche (Wirka, 1988).

Solo en el Estado de Nuevo León, México, se desechan alrededor de 2,000 toneladas de plástico anualmente en forma de pañales desechables (Martínez y Dieck, 1994).

En el área metropolitana de Monterrey se producen al día alrededor de 2000 toneladas de desechos domésticos y 4500 toneladas de desechos industriales, que por su

**inadecuado tratamiento provocan daños irreparables al ambiente y a la salud de la población (Rizzo *et al*, 1995).**

**El volumen de ventas internas de petroquímicos, específicamente polietileno de baja densidad en México, para 1992, fue de 327,310 toneladas con un valor de 759,784 miles de nuevos pesos. En 1994 el volumen de producción específicamente de bolsas de plástico fue de 7 193 toneladas con un valor de 69 852 miles de nuevos pesos (Censos Económicos, INEGL 1994).**

## **PLÁSTICOS BIODEGRADABLES.-**

### **Que es Biodegradable?**

**Muchas reuniones y congresos se han llevado a cabo para resolver la confusión sobre las diferentes terminologías acerca del significado de biodegradación y establecer definiciones así como estándares avalados por la Sociedad Americana para Materiales y pruebas (ASTM). En uno de estos congresos se distingue entre plásticos bidegradables, aquellos plásticos que han sufrido un cambio significativo en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas, resultando en la pérdida de algunas propiedades; plásticos biodegradables, aquellos en los que la degradación es resultado de la acción de microorganismos que se encuentran en la naturaleza tales como bacterias, hongos y actinomicetos; plásticos fotodegradables, en los que la degradación resulta de la acción de la luz solar y plásticos degradables por hidrólisis, en los que la degradación, como su nombre lo dice resulta de la hidrólisis (Narayan *et al*, 1991). Una definición mas actualizada sobre el**



término de biodegradación menciona que es el proceso en el cual material polimérico es desintegrado o reducido a pequeñas partículas o moléculas por organismos o sus enzimas, de tal manera que el carbón contenido en el material finalmente retorne a la biosfera (Gordon *et al*, 1996).

La historia de la biodegradación es relativamente reciente y los esfuerzos para utilizar material biodegradable se ha incrementado en respuesta a la concientización ambiental.

La presencia de plásticos en hábitats de la vida silvestre, tanto en tierra como en el mar a inducido a los ambientalistas a demandar soluciones por parte de la industria del plástico. Las soluciones propuestas son reciclaje, incineración, y degradación ambiental. Esta última se refiere a la fotodegradación o ataque por radiación ultravioleta, y biodegradación o ataque por microbios. La biodegradación de un material polimérico es debido al ataque de microbios como bacterias y hongos vía enzimática. El resultado es pérdida completa de la integridad estructural como resultado del decremento drástico en el peso molecular.

La primera generación de materiales biodegradables consistió en mezclas de polímeros con fuentes naturales de alimentación como el almidón. El segundo intento se concentró en la inserción de grupos funcionales tales como enlaces éster sobre la estructura base polimérica, siendo estos grupos susceptibles al ataque microbiano. El tercer avance es el desarrollo de materiales como el polihidroxibutirato (PHB) que son naturalmente sintetizados por bacterias creciendo dentro de fermentadores. Estos últimos pueden ser considerados como verdaderamente biodegradables. Las aplicaciones de estos materiales es muy grande, desde aplicaciones médicas como implantes de cirugía y de soportes para

drogas de liberación prolongada, hasta aplicaciones agrícolas tales como acolchado, y muchas aplicaciones tradicionales de empaque.

Las tres principales clases de plásticos biodegradables corresponden a tres estados de desarrollo. El primero, son mezclas de polímeros con aditivos que son rápidamente consumidos por microorganismos. El ejemplo clásico de esta clase de materiales es el uso de mezclas de almidón con polietileno para la fabricación de bolsas biodegradables (Otey y Westhoff, 1984). Las principales áreas de investigación se han concentrado en la determinación de agentes que hagan compatibles los componentes de las mezclas y en los parámetros de procesamiento.

La segunda clase de material son polímeros sintéticos con grupos vulnerables susceptibles a la hidrólisis por ataque microbiano. Un ejemplo es la policaprolactona, usada en la fabricación de almácigos en agricultura. Diversas investigaciones han sido dirigidas también sobre fibras de poliadipato de tetrametileno, copolímeros de polietilensuccinato y polietilenglicol, y copolímero de politetrametilglicol y polietilensuccinato. Termoplásticos biodegradables a base de copolímeros de ácido láctico han sido sintetizados para uso en aplicaciones marinas y biomédicas (Lee *et al.* 1991).

La tercera clase de material son polímeros que se encuentran comúnmente en la naturaleza, su existencia se conoce por más de 50 años. Polihidroxibutirato (PHB), fue descubierto primeramente por Lemoigne (1927), como un depósito de fuente de carbono dentro de ciertas bacterias durante la fermentación en medio ambiente deficiente de un nutriente vital, como lo son el nitrógeno, fósforo, azufre, u oxígeno. De esta manera este

microorganismo puede producir más del 80% de su peso de PHB cuando su crecimiento está artificialmente limitado (Holmes *et al*, 1988).

PHB es verdaderamente biodegradable, y puede ser atacado por una gran variedad de microorganismos. Las aplicaciones de este material son muy amplias en el área biomédica, de empaque y campo agrícola. Otro biopolíester de esta clase es el hidroxipentanoato, también conocido como 3-hidroxivalerato (PHV). Este es producido alimentando ciertas bacterias como *Alcaligenes eutrophus* con sustratos de carbono específicos como ácido acético y propiónico en un medio deficiente en nitrógeno o fósforo. El área principal de investigación se ha concentrado en morfología, cinética de cristalización y propiedades mecánicas. Aunque los métodos de fermentación y extracción se han perfeccionado recientemente, la determinación de parámetros de procesamiento y altos costos de producción son problemas que tienen que resolverse.

Para que la biodegradación pueda ocurrir, los siguientes prerrequisitos generales deberán presentarse:

- 1.- Presencia de microorganismos tales como hongos, bacterias, actinomicetos, etc.
- 2.- Presencia de oxígeno, humedad, y nutrientes minerales.
- 3.- Rangos de temperatura de 20 a 60° C dependiendo del tipo de microorganismo y
- 4.- Un rango de pH de 5 a 8.

Las aplicaciones de los polímeros biodegradables se han enfocado en tres áreas principalmente: medicina, agricultura, y empaque de productos de consumo. Algunos de

estos han resultado en productos comerciales. Debido a su naturaleza especializada y a su mayor valor unitario, las aplicaciones médicas se han desarrollado mas rápido que las otras dos.

*Aplicaciones Médicas:* Se han desarrollado implantes quirúrgicos en cirugía vascular y ortopédica, como implantes de matrices para colocar drogas dentro del cuerpo para una liberación lenta y controlada; suturas quirúrgicas absorbibles, y para uso en ojos. La ventaja de estos productos es el evitar la cirugía de remoción (Potts, 1978).

*Aplicaciones Agrícolas:* Probablemente la mayor aplicación comercial de polímeros degradables es el uso de polímeros de formaldehído-urea en fertilizantes de liberación lenta, los cuales también se utilizan en la formulación de alimentos balanceados en acuicultura con la finalidad de dar mayor estabilidad al gránulo en el agua y evitar su desmoronamiento antes de ser consumido por el animal (Cruz, 1996. Comunicación personal). Se cree que un mercado potencial grande existe para los contenedores biodegradables, para transplantar flores anuales, vegetales y arbustos ornamentales.

*Aplicaciones para plásticos para empaque:* Debido al gran incremento en el uso de membranas y recipientes de plástico para productos desechables, el uso de plásticos biodegradables se ha incrementado rápidamente. Mezclas de polietileno con almidón han tenido un gran éxito en el mercado. Los plásticos biodegradables son deficientes en las propiedades requeridas para la mayoría de las aplicaciones que implica empaque y son mas caros que los usados comúnmente. sin embargo, estudios mas profundos son necesarios para ganar mas mercado para los plásticos biodegradables.

El uso de mezclas a base de almidón es una realidad comercial debido al bajo costo y gran disponibilidad del almidón. Varias dificultades en cuanto al procesamiento deben resolverse aún. En base a investigaciones realizadas sobre estos plásticos, se ha demostrado que la velocidad de degradación es básicamente una función de la estructura y el medio ambiente. Sin embargo, hay que reconocer que las presentes aplicaciones de plásticos a base de almidón son aún relativamente limitadas y no figuran del todo en las áreas que no sean de empaque o médicas. El futuro de los plásticos biodegradables claramente apunta en dirección de polímeros sintéticos con uniones hidrolizables, así como aquellos polímeros biodegradables que se encuentran normalmente en la naturaleza. Estos son biocompatibles y tienen aplicaciones en áreas donde la biodegradación es una ventaja.

Es imposible hacer predicciones sobre la velocidad exacta de degradación en plásticos degradables, ya que la composición del suelo, humedad y temperatura tienen efectos directos sobre el rompimiento. Sin embargo, asumiendo un clima templado, lluvias normales y un drenado apropiado del suelo se podrían hacer las siguientes observaciones: polietileno sin agentes de degradación adicionados, podría alcanzar la desintegración en 200 a 400 años; por otra parte, los plásticos biodegradables (con menos del 10% de agentes de biodegradación) alcanzan la desintegración total en menos de 20 años (Bolletín of National Corn Growers Association).

### **PROPIEDADES DEL ALMIDÓN.-**

El almidón se encuentra almacenado en plantas como gránulos o partículas sólidas que consisten en dos biopolímeros, amilosa y amilopectina. Los gránulos pueden variar en

tamaño desde unas cuantas micras hasta 15 o más micras, dependiendo de la planta donde se obtengan. La amilosa es una molécula lineal que consiste en residuos de alfa-glucopiranosil unidos por enlaces 1,4 glicosídicos. Las moléculas de amilopectina, están altamente ramificadas, con residuos de alfa glucopiranosil unidos por enlaces 1,4 glicosídicos y por alfa 1,6 en los puntos de ramificación. La porción lineal de amilopectina representa cerca del 30% del almidón de maíz común y tiene un peso molecular de 200,000-700,000, mientras que las moléculas de amilopectina tienen un peso molecular en un rango que va entre 100-200 millones. Estudios ultraestructurales del almidón han demostrado dos dominios morfológicos distintos: un dominio cristalino, compuesto principalmente por amilopectina; y un dominio amorfo, compuesto principalmente de amilosa.

El almidón es predominantemente hidrofílico debido a la presencia de tres grupos hidroxilo en cada unidad monómerica. Consecuentemente, el almidón cambia su contenido de humedad conforme cambia la humedad relativa; dependiendo de la fuente botánica y del vapor de agua o de la humedad relativa de un medio ambiente dado, el contenido de humedad del almidón puede variar. El almidón es térmicamente estable hasta cierto grado, sin embargo el tratamiento térmico del almidón seco (pirólisis) puede inducir cambios irreversibles en la estructura física y en las propiedades químicas. Los gránulos de almidón se hinchan debido al incremento en la difusión y pérdida de la cristalinidad. El calentamiento del almidón en soluciones acuosas a temperaturas arriba de 60° C rompe los gránulos irreversiblemente; esto es evidente por la pérdida de la refringencia. El proceso es llamado gelatinización (Imam *et al*, 1996).

Por otro lado, la presencia de los grupos hidroxilo en los carbonos 1 y 2 ofrecen la oportunidad de realizar modificaciones químicas sobre la molécula de almidón, (derivatización), dándole propiedades nuevas y útiles.

El almidón que ha sido extruido, típicamente a una humedad de 15-25% y 160-200° C, presenta una estructura muy amorfa (Shogren, 1992; Chinnaswamy *et al*, 1989). Se ha podido observar que después del enfriamiento, se forman pequeñas cantidades de complejos cristalinos tipo V de amilosa-lípido (esto con almidones provenientes de maíz o trigo los cuales contienen ácidos grasos libres y fosfolípidos) (Shogren, 1992).

Cuando el almidón es extruido con aproximadamente 15% de humedad presenta una fuerza de tensión inicial de 20-30 MPa y 10-15% de elongación, estas son propiedades útiles para algunos artículos moldeados pero inadecuadas para la elaboración de membranas. además, el almidón extruido almacenado a temperatura constante y niveles de humedad bajos presenta un gradual decremento en su elongación resultando en un material más quebradizo. La velocidad de envejecimiento parece variar con la estructura del polímero, pero las razones del porque se presentan estas diferencias aun no se entiende (Shogren, 1992).

Otro problema en relación a la estructura amorfa que presenta el almidón al ser extruido es la tendencia a disolverse en agua, esta propiedad limita las aplicaciones que impliquen la exposición de productos a base de almidón moldeados al calor o al agua como lo serían en el manejo de alimentos. Algunos logros para mejorar las propiedades mecánicas del almidón extruido, como la resistencia a la humedad y una estabilidad temporal, incluyen modificaciones químicas, cambios en la estructura del almidón, adición de plastificantes y el

mezclarlo con otros polímeros. Niveles altos de almidón gelatinizado (40-50%) pueden ser mezclados con el copolímero de ácido acrílico y etileno (EAA) para producir membranas con buenas propiedades mecánicas, resistencia a la humedad, y estabilidad. Algo de este almidón puede formar inclusiones tipo V con el EAA, provocando una fina dispersión del almidón dentro del EAA, sin embargo este EAA no es biodegradable y podría en determinado momento evitar la disponibilidad del almidón a la degradación por microorganismos (Fanta *et al*, 1992).

Algo que se ha podido establecer claramente es que las propiedades fisico-químicas del material termoplástico varían considerablemente con el tipo de almidón utilizado.(Van der Zee *et al*, 1991).

## **PLÁSTICOS A BASE DE ALMIDÓN.-**

Griffin (1973) reportó y patentó el uso del almidón como un material biodegradable de relleno en plásticos con polietileno de baja densidad (PEBD).

Copolímeros de polimetilacrilato con almidón, fueron desarrollados y extruidos en forma de membrana mostrando excelente fuerza de tensión y elongación iniciales, posteriormente estas muestras fueron expuestas al ataque de hongos como *Aspergillus niger* perdiendo mas del 40% de su peso después de 22 días de incubación. El parámetro físico de fuerza de tensión y los estudios de microscopía electrónica de barrido indicaron una degradación substancial de la porción de almidón del copolímero (Dennenberg *et al*, 1978).



Otey y Mark (1976), realizan un estudio de la elaboración de plásticos biodegradables a base de almidón con polivinilalcohol, glicerol y una cubierta resistente al agua. Posteriormente en ese mismo año este procedimiento es patentado por el mismo autor y actualmente los plásticos elaborados con este procedimiento son utilizados en el sector agrícola como cubiertas protectoras para cultivos estacionales.

El mismo autor descubre que mezclando el almidón con el copolímero etilen-ácido acrílico (EAA), se obtenían plásticos con mejor resistencia al agua y mejores propiedades mecánicas. (Otey *et al*, 1977). En 1979, patenta el uso de EAA en la elaboración de plásticos biodegradables a base de almidón. (Otey y Westhoff, 1979; 1982).

El efecto de diversos plastificantes sobre plásticos a base de almidón y polivinilalcohol (PVA), fue analizado, encontrando que el uso de sorbitol tiene un buen efecto en plásticos con altos niveles de almidón, mientras que el glicerol es un plastificante efectivo en plásticos con bajos niveles de almidón (Westhoff *et al*, 1979).

Hasta esta fecha los diferentes estudios realizados para la elaboración de plásticos biodegradables a base de almidón, habían utilizado las técnicas de moldeado, extrusión simple o la incorporación de almidón molido en EAA; todos estos considerados procesos lentos y más caros que las técnicas convencionales de extrusión y soplado. Es entonces cuando Otey en 1982, patenta el uso de la técnica de extrusión y soplado en la elaboración de plásticos con un 60% de almidón y varios niveles de EAA y polietileno (PE), logrando obtener plásticos estables a condiciones ambientales por un período de tiempo y una fácil descomposición posterior. (Otey y Westhoff, 1982). La técnica de extrusión es un método común y económico para producir películas en la cual un extruido tubular es expandido y

moldeado por una presión interna de aire para formar una burbuja de un tamaño varias veces mayor de la abertura del dado (Barrón, 1989).

Estudios preliminares sobre la difusión en plásticos a base de almidón y varios niveles de EAA, demuestran que estos permiten el paso de moléculas pequeñas de urea y NaCl muchas veces más rápido que moléculas de grandes azúcares, posteriormente la fabricación de plásticos semipermeables a base de almidón para su uso como membranas de diálisis fue patentada (Otey y Westhoff, 1984a,b).

Al estudiar el efecto de la adición de urea en formulaciones de plásticos a base de almidón y el copolímero de etilen-ácido- acrílico, se observa que el principal efecto de la urea fue permitir la gelatinización del almidón a bajos niveles de agua, permitiendo la extrusión directa de una membrana uniforme a partir de una mezcla semiseca (Otey *et al*, 1987).

Hasta ese momento, se habían estudiado dos diferentes tecnologías para la producción de plásticos con almidón, el método de Griffin donde se incorporan partículas granulares de almidón dentro de polímeros a base de petróleo, y la tecnología descrita por Otey, donde utilizan almidón gelatinizado dentro de los polímeros sintéticos, obteniéndose una distribución más homogénea de las moléculas de almidón dentro de la matriz plástica. Esta última tecnología puede desarrollarse por medio del método húmedo o semiseco, este último es el más utilizado, donde se incorpora urea cuya función es reducir la cantidad de agua y tiempo requerido en la gelatinización del almidón para su posterior extrusión (Swanson *et al*, 1987).

Las propiedades físico-mecánicas de los plásticos elaborados a base de almidón varían fuertemente con el tipo de almidón utilizado, estableciendo una clara dependencia de la fuerza de estos plásticos sobre la relación amilosa-amilopectina (Van der Zee *et al*, 1991).

También se ha observado que los diferentes métodos para incorporar el almidón dentro de la matriz sintética y el procesamiento de esta mezcla influye en las propiedades físico-mecánicas del producto, lo cual finalmente afecta la velocidad y el grado de biodegradación en dichos plásticos (Imam, S.H. *et al* 1995).

Gould *et al*, (1990) mencionan la confusión que existe acerca de la definición del término biodegradable y la necesidad de aclarar esta situación, ya que iniciativas gubernamentales y legislativas tienen el propósito de legislar el uso de plásticos biodegradables y no biodegradables.

Estos mismos investigadores establecen la necesidad de un método estandarizado para determinar la velocidad a la cual el almidón contenido en estos plásticos es metabolizado por microorganismos. Para este propósito desarrollan un ensayo simple de laboratorio para medir la degradación biológica de plásticos con almidón., para lo anterior utilizaron un medio de cultivo definido y una mezcla de microorganismos del género *Bacillus* sp. Sus resultados indicaron que la porción de almidón presente fue metabolizada por los microorganismos y que la cantidad de almidón puede influir en la velocidad de desintegración física en el medio ambiente (Gould *et al*, 1990).

Otros estudios enfocados a definir si la velocidad de biodegradación ambiental de estos plásticos, depende de la capacidad de colonización de las superficies de estos plásticos

por microorganismos amilolíticos, han sido realizados por Syed Imam en 1990. Este autor utilizó una cepa altamente amilolítica de *Arthrobacter* encontrando que la adhesión de este microorganismo a los plásticos que contenían almidón no era un requisito para la degradación enzimática del plástico (Imam y Gould, 1990).

En estudios en ambientes acuáticos para observar el efecto de estos ecosistemas sobre plásticos elaborados a base de almidón-PE y almidón-EAA, se encuentra que en plásticos con un 40% de almidón, este es consumido en aproximadamente 60 días, mientras que ninguna o muy poca degradación se presentó en los plásticos sintéticos en el mismo período de tiempo.

En este mismo trabajo se concluye que la degradación del almidón sobre plásticos expuestos en ambientes acuáticos puede ocurrir por varios mecanismos: a) por acción enzimática y actividad microbiana presente en el ambiente y/o asociada con el biofilm sobre la superficie expuesta, b) ingestión o consumo por organismos pequeños como insectos y c) por desintegración mecánica, resultado de la disociación del almidón, PE y EAA dentro de la matriz plástica (Imam *et al*, 1992).

En la degradación de plásticos denominados ECOSTAR<sup>®</sup>, el cual contiene almidón modificado para hacer hidrofóbica la superficie naturalmente hidrofílica del almidón, y de ECOSTAR PLUS<sup>®</sup>, el cual presenta un ácido graso o un prooxidante para facilitar el rompimiento del polímero, proceden dos mecanismos interactivos: el consumo de los gránulos de almidón formando agujeros que incrementan el área de superficie del plástico y engrandecen el potencial de migración de los reactivos dentro de la matriz, como enzimas extracelulares de microorganismos que pueden realizar un ataque directo sobre el polímero.

El otro mecanismo es resultado de peróxidos formados por el prooxidante cuando este comienza a estar en contacto con sales de metales presentes en el suelo o agua (Maddever y Campbell, 1990).

Un método para determinar la degradación del almidón en plásticos, basado en el uso de enzimas específicas en un sistema "in vitro" es reportado. Se encontró que la cantidad de almidón degradado varió significativamente en el tipo de plástico usado, aunque la cantidad de almidón en todos los casos fue baja, lo cual concuerda con los trabajos de Imam y Gould. (Allenza *et al*, 1990).

La habilidad de degradación en polietileno lineal de baja densidad (PELBD) con 6 % de almidón y prooxidantes por varias especies de *Streptomyces* y del hongo *Phanerochaete chrysosporum* fue estudiada a nivel de laboratorio por un período de 20 días. Se encuentra que *Streptomyces viridiosporus* produce la mayor pérdida en peso en los diferentes tratamientos (Lee *et al*, 1991).

Un estudio en el cual midieron la degradación de plásticos de polietileno de baja densidad (PEBD) con diferentes concentraciones de almidón y un metal de transición, demuestran que altos niveles de prooxidantes y elevadas temperaturas producen más rápidamente los cambios en las propiedades físicas de los plásticos estudiados (Iannotti *et al*, 1990).

La degradabilidad de bolsas a base de polietileno y almidón utilizadas para la colección de desechos de jardín, las cuales contenían aditivos para promover la fotodegradación del polietileno y oxidantes para promover la degradación química del mismo fue medida, encontrándose que bolsas con 9 % de almidón y aditivos promueven

mecanismos múltiples de degradación a una velocidad aceptable, mientras que bolsas con 6 % de almidón más oxidantes se desintegran lentamente (Cole y Leonas, 1990).

Estudios sobre la biodegradación en plásticos con polietileno y almidón dentro de pilas activas de composteo establecen que las condiciones de estrés oxidativas así como la gran variedad de poblaciones microbianas hacen del sistema de composta un ecosistema útil para el ataque de sustancias difíciles de degradar en otros ecosistemas. Se observa que la dinámica de los factores físicos y químicos actuaron severamente sobre los polímeros probados. El ecosistema de composta se propone como una prueba para la evaluación de la biodegradabilidad de materiales termoplásticos (Corti *et al*, 1991).

Un protocolo básico para estimar la biodegradabilidad de polímeros en el medio ambiente por medio de la tecnología de hibridización de ADN para detectar microorganismos que degradan polímeros en el ambiente, fue propuesto. Utilizaron una sonda de PHB depolimerasa obtenida a partir de *Alcaligenes faecalis*, la cual hibridizó con varios fragmentos de ADNs cromosomal digeridos de una cepa no identificada, no encontrando hibridización con el ADN del control negativo *E. coli* (Uchida *et al*, 1991).

En un ambiente de composta se caracterizó la degradación química de 11 bolsas a base de polietileno y almidón producidas comercialmente. Se encuentra que los plásticos recuperados del interior de la composta mostraron poca degradación en comparación con los recuperados en el exterior. La tensión de oxígeno sobre la superficie de la membrana parece ser el componente que limita la velocidad de degradación en el ambiente de composta. Todos los plásticos que contenían metales de transición demostraron una rápida degradación oxidativa térmica a 70° C. Estos aditivos presentaron la mejor actividad

catalítica siendo los promotores de la degradación oxidativa del polietileno (Johnson *et al*, 1993).

Mediciones sobre la degradación de bolsas fabricadas con polietileno y ECOSTAR PLUS<sup>R</sup> en un sistema de composteo pasivo indicaron que la exposición a la luz solar tiene un marcado efecto en la degradación de bolsas expuestas a la superficie, mientras que la degradación en las bolsas colocadas en el interior de la composta fue menor involucrando posiblemente otros procesos no relacionados con fotodegradación (Greizerstein *et al*, 1993).

En un estudio en diferentes localidades de EUA a tres tipos de polietileno fotodegradable para medir su desintegración bajo diferentes temperaturas de energía solar, se observa que las velocidades de desintegración varían grandemente según la localidad de exposición, fenómeno explicado en término de los diferentes niveles de radiación y temperaturas en dichas localidades. Además, establecen que la variación en el porciento de elongación es una buena medida de la fotodegradabilidad de los plásticos expuestos bajo condiciones determinadas (Andrady *et al*, 1993).

En ambientes acuáticos simulados se examinó el efecto de la composición química, intensidad de la luz solar y la presencia de microorganismos en el agua sobre la velocidad de desintegración de plásticos convencionales y de aquellos modificados químicamente; se encontró que los plásticos ubicados sobre la superficie del agua mostraron una pérdida más rápida de sus propiedades que aquellos parcialmente sumergidos, esto podría ser atribuido al decremento de intensidad de luz y calor recibido, sin embargo los plásticos que mostraron

cambios más rápidos fueron los que estaban en presencia de luz ultravioleta sin agua, comparados con aquellos en donde el agua estaba presente (Leonas y Gorden, 1993).

Estudios sobre la velocidad de deterioro de plásticos a base de almidón y polietileno de baja densidad en cinco diferentes ecosistemas: basureros, composta, suelo, agua de mar y pantano en un lapso de 28 meses, muestran que la degradación más rápida se presentó en los plásticos colocados en el pantano y que la velocidad de pérdida del almidón presente en los plásticos, disminuyó con el tiempo. Se concluye que aunque este material está diseñado para ser deteriorado principalmente por la acción de microorganismos, la degradación de estos plásticos en este estudio fue el resultado de una interacción biológica, química y de procesos físicos (Breslin y Swanson, 1993; Breslin y Boen, 1993).

La velocidad de degradación de plásticos a base de almidón y polietileno de baja densidad en un relleno sanitario por un período de dos años fue determinada. Se encuentra que la elongación decrece en un 92 y 44 % para los plásticos que contenían PEBD y PEBDL, respectivamente. Se presentó una pérdida de almidón del 33 y 25% para PEBD y PEBDL, respectivamente durante los dos años de estudio. La degradación limitada de estos plásticos es atribuida a la ineffectividad del prooxidante para catalizar la oxidación del PE bajo las condiciones presentes en el relleno sanitario. Concluyen que aunque se presentó actividad biológica, la velocidad de biodegradación en el relleno sanitario fue baja (Breslin, 1993).

Investigaciones sobre los diversos métodos para medir la biodegradabilidad de plásticos con componentes biodegradables y fotodegradables se realizaron en suelo por un período de tres meses bajo condiciones consideradas favorables. Muestras de plásticos



elaborados con PE y almidón, PE fotosensibilizado, PVC con alto contenido de plastificantes y polipropileno, fueron analizadas. Se demuestra que la liberación de CO<sub>2</sub> es una herramienta útil para medir la biodegradación, pero que cuando existe la presencia de aditivos, la biodegradación del polímero necesita ser confirmada por cromatografía de permeación en gel (GPC) para medir la reducción en tamaño molecular del polímero; sin embargo este método es costoso y se recomienda para verificación más que para análisis de rutina. (Asha y Bartha, 1994).

Una revisión reciente sobre diversos sistemas y métodos para medir biodegradabilidad, describe a la exposición en suelo como una forma deseable para probar la mayoría de los plásticos a base de almidón debido a su similitud con las condiciones que se encuentran en los basureros. Típicamente las muestras son colocadas en el suelo por periodos de 7 meses y luego examinada la pérdida en peso, el decremento en la fuerza mecánica, así como en los cambios químicos específicos. Así mismo, debido al tratado sobre la contaminación del mar dictado en 1987, el cual prohíbe dessechar plásticos de los barcos hacia el mar, los investigadores han usado hábitats acuáticos representativos para probar propiedades de degradación.

Sin embargo aunque existen métodos para determinar el grado de biodegradación in situ, estos generalmente se relacionan con la pérdida en peso. Cuando este parámetro se utiliza únicamente con plásticos a base de almidón, no es posible determinar las cantidades de almidón y del polímero sintético que permanecen en la muestra. Por lo que es necesario un método que permita determinar la degradación en todos los componentes (Gordon *et al*, 1996).

Dentro de las técnicas más actuales se encuentra la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  en estado sólido. (CP/MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR). Este método se basa en la resonancia de los carbonos presentes en un compuesto las cuales son características según la distribución espacial de dicha molécula. Con esta técnica es posible estimar el contenido de almidón residual en muestras a base de almidón-EAA-PE degradadas enzimáticamente, ya que provee información acerca de la estructura terciaria, así como de las interacciones entre los componentes individuales.

La técnica de Cross-polarization/magic angle spinning (CP/MAS)  $^{13}\text{C}$ -NMR se utilizó para evaluar la degradación de almidón en muestras a base de este polisacárido y una mezcla de PE-EAA fabricadas por el método de moldeo por inyección, las cuales fueron expuestas a la actividad enzimática de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* y alfa-amilasa pancreática de porcino. Se observó como el material tratado con la enzima pancreática mostró una disminución de las intensidades de resonancia de las moléculas de carbón características del almidón, comparativamente mayor que cuando se usó la enzima microbiana. Mediante esta técnica fue posible estimar el contenido de almidón residual además de brindar información sobre la estructura del material no degradado, donde se observó que almidón cristalino es acomplejado en unas estructuras tipo V, las cuales ya habían sido previamente descritas por Shogren *et al* 1992 en membranas elaboradas con almidón-EAA-PE. Se postula que el almidón amorfo se encuentra accesible a las enzimas mientras que el almidón cristalino que se encuentra en las estructuras tipo V y que se acompleja con EAA se encuentra inaccesible, al mismo tiempo dichas estructuras comienzan a ser más aparentes conforme el almidón amorfo es degradado (Imam *et al*, 1993).

Métodos cuantitativos han sido también citados como el uso de un isótopo estable ( $^{13}\text{C}$ ). Este método se basa en las diferencias naturales en concentración de  $^{13}\text{C}$ , entre polímeros de almidón y polímeros petroquímicos. Se ha observado que el contenido de  $^{13}\text{C}$  en una muestra de plástico-almidón es una combinación cercana a lo lineal de las marcas de  $^{13}\text{C}$  de los componentes, y esto hace una mezcla isotópicamente distinta de otra.

La utilización de Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (IRTF) ha sido utilizada para medir la biodegradación de componentes individuales en mezclas poliméricas, ya sea por el método de proporción de absorbancia o en el caso de muestras con más de dos componentes por curvas de calibración de multicomponentes, y así utilizando ecuaciones simultáneas, determinar la concentración del componente deseado en la muestra (Gordon *et al*, 1996).

## **BIODEGRADACION DEL ALMIDON.-**

El almidón es metabolizado por organismos que producen amilasas, enzimas que rompen los enlaces glucosídicos entre los residuos alfa-glucopiranosil del almidón. Estas enzimas son producidas por una gran variedad de organismos, incluyendo al hombre, animales, plantas, bacterias y hongos. La mayoría de las amilasas tienen un peso molecular de 50,000 y son secretadas por las células, almacenadas en espacios periplasmicos o localizadas en tejidos específicos. En general, las amilasas pueden dividirse en dos clases. La primera consiste en glucosidasas (hidrolasas) donde se incluye la  $\alpha$ -amilasa, endoenzima que hidroliza enlaces  $\alpha$ -1,4 glicosídicos al azar sobre la molécula de almidón;  $\beta$ -amilasa,

exoenzima que remueve unidades de maltotriosa del extremo no reductor de la cadena del polímero, sin romper en las uniones  $\alpha$ -1,6; las glucoamilasas, exoenzimas que remueven unidades de glucosa sucesivas del extremo no reductor pero que también son capaces de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,6; las puhulanasas, endoenzimas que hidrolizan enlaces  $\alpha$  -1,6 glicosídicos presentes en el pululan, un polímero lineal de maltotriosas unidos por enlaces  $\alpha$ -1,6. La segunda clase de enzimas degradadoras de almidón consiste en glicosiltransferasas las cuales hidrolizan los substratos y participan en reacciones que involucran la transferencia de grupos glicosilos (Imam *et al*, 1996).

#### **PERSPECTIVAS EN EL MERCADO PARA PLÁSTICOS BIODEGRADABLES.-**

Polímeros biodegradables de la segunda generación, promovidos por la industria, comienzan a ser totalmente biodegradables, están disponibles comercialmente desde 1990. En 1993 la familia mas importante de polímeros biodegradables fueron los polímeros a base de almidón. Otros que estuvieron comercialmente disponibles incluían policaprolactona y otros poliesters tales como ácido poliláctico, polihidroxitirato-valerato, alcohol polivinílico y acetato de celulosa Tabla 1 (Mayer y Kaplan, 1994).

En 1993 la demanda total de polímeros biodegradables en los Estados Unidos, Europa Occidental y Japón alcanzó los 25 millones de libras (11 mil toneladas métricas) valuadas en 50 millones de dólares. El consumo en Estados Unidos y Europa Occidental fue aproximadamente el mismo, mientras que Japón informó menos del 5% de la demanda de 1993. El principal problema para el crecimiento del uso de polímeros biodegradables es el

costo. En los Estados Unidos, los polímeros biodegradables están cotizados a \$ 2.50-8.00 por libra debido a los costos elevados, la mayor aplicación de estos polímeros es en el área de empaque (McCarthy, L. 1993). Sin embargo para 1995 se estimó que solo el mercado Europeo para los plásticos biodegradables alcanzaría 172 billones de dólares. (Augusta *et al*, 1993).

Aproximadamente una docena de plásticos biodegradables se encuentran actualmente en el mercado, lo cual representa un amplio rango de posibilidades de aplicación para los consumidores Tabla 2. Se estima que el mercado global para estos plásticos se encuentra arriba de 1.3 billones de kg por año (Poirier *et al*, 1995).

Plásticos biodegradables se encuentran disponibles, pero únicamente son utilizados en mercados específicos; además del empaçado esta el área médica donde se fabrican suturass y cápsulas farmacéuticas. Esto debido como ya se mencionó, al costo (\$ 8 a \$ 10 dls por libra), que implica la elaboración del plástico biodegradable a partir de bacterias, mientras que el costo de los plásticos convencionales a base de petróleo es únicamente de 60 ¢ por libra. (McCarthy, L. 1993).

Varios factores, además del costo, podrían ser importantes en determinar el futuro crecimiento de los polímeros biodegradables. Un obstáculo podría ser la falta de infraestructura de sistemas de composteo. El composteo a gran escala podría proveer el medioambiente ideal para descartar los desechos biodegradables y ciertamente este ecosistema fue seleccionado como el primer sistema de desecho para estudiar la biodegradabilidad de este tipo de polímeros (McCarthy, 1993).. Europa occidental ha

hechos progresos hacia el desarrollo de infraestructura de composteo, sin embargo en EUA y Japón esto no ha sucedido.

El ácido láctico es la unidad básica de un polímero biodegradable que puede utilizarse en la elaboración de plásticos biodegradables, algunos investigadores de compañías como Golden Technologies Company (Golden, Colorado) están utilizando bacterias modificadas por ingeniería genética para convertir los azúcares que se encuentran en el papel de desecho y desechos agrícolas, en ácido láctico. Los plásticos elaborados a partir de ácido láctico pueden ser utilizados para un amplio rango de productos incluyendo, suturas, para liberación de drogas, implantes ortopédicos, pañales desechables, membranas plásticas, y cuchillería desechable. (Mayer y Kaplan, 1994).

La Sociedad de Plásticos Biodegradables fundada en 1989, es el centro industrial de investigación sobre plásticos biodegradables en Japón, integrando y coordinando la mayoría de la investigación académica, en la industria y centros de investigación del gobierno. Esta organización se encuentra probando tecnología y oportunidades de mercado de manera que Japón podría estar en posición de dominar los mercados mundiales cuando la tecnología sea adoptada.

En la 3a. Reunión Internacional sobre Plásticos Biodegradables y Polímeros realizada en Ozaka, Japón en 1993, por la Sociedad de Plásticos Biodegradables de Japón, diferentes tópicos relacionados con estos productos fueron analizados. Entre los principales aspectos tratados fueron: la síntesis y propiedades de nuevos plásticos biodegradables, el desarrollo de nuevos métodos de prueba, las políticas gubernamentales sobre regulación y estándares. Se mencionó que la BPS había desarrollado una definición de biodegradabilidad consistente

con la de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM). Se discutió la composta como un sistema de desechos para polímeros biodegradables en Japón, sugiriendo que para los Juegos Olímpicos de Invierno en Noruega, todos los recipientes de comida e implementos podrían elaborarse a partir de plásticos biodegradables y posteriormente introducidos en sistemas de composta para asegurar la efectividad de este método.

No hubo muchas expectativas por parte de los miembros de BPS sobre el mercado que los plásticos biodegradables podrían tener. Ellos ven únicamente un mercado de  $15 \times 10^9$  yens para fines del siglo, una cantidad que es equivalente a 150 millones de dólares al cambio actual.

En Europa y Japón existen pocos sitios disponibles para rellenos sanitarios. Debido a que el principal componente de los desperdicios domésticos son los plásticos, existe un gran interés en el reciclaje de estos y en la producción de materiales plásticos que sean seguros y fácilmente eliminados en el medio ambiente. Los polihidroxicanoatos son una familia de poliésteres que se encuentran en la naturaleza, son producidos en forma de gránulos como fuente de almacenamiento de carbono por muchas bacterias. La compañía de bioproductos Zeneca, Billingham, U.K., (anteriormente ICI) se encuentran produciendo estos polímeros a escala piloto bajo el nombre comercial de BIOPOL™, copolímero del ácido 3-hidroxi-butirato y ácido 3-hidroxi-valerato (PHB/HV). Es producido por fermentación de la bacteria *Alcaligenes eutrophus* en un medio con glucosa y ácido propiónico (Holmes, P.A. 1988).

Actualmente produce aproximadamente 1,000 toneladas por año del copolímero P(3HB-HV) a un costo aproximado de \$ 15 dólares por Kg, y consideran que a una

velocidad de producción de 10,000 toneladas por año o más, podría disminuirse el costo del copolímero a \$ 5 dólares por Kg. que es el precio aproximado de otros plásticos biodegradables (Poirier *et al*, 1995). (Mergaert, *et al* 1991).

Muchos científicos se han enfocado en este material y en sus propiedades así como en sus posibles aplicaciones. En general el PHB combina tres características: es 100% biodegradable, puede procesarse como un termoplástico y es 100% resistente al agua (Hrabak, 1991).

Para llevar el PHB hacia la producción de plásticos biodegradables es absolutamente necesario disminuir los costos de producción de este metabolito microbiano. Los costos de producción podrían disminuirse significativamente utilizando metanol como sustrato de fermentación ya que el metanol es uno de los sustratos mas baratos y disponible el cual se puede obtener a partir del gas natural y de biomasa si es necesario.

En un estudio sobre la producción de PHB usando metanol como sustrato en un sistema de fermentación alimentado y *Methylobacterium extorquens* como microorganismo, obtienen un proceso de fermentación bien controlado en donde logran obtener biomasa de 120 g/L (peso seco) y niveles de PHB de 60 g/L. (Bourque *et al*, 1991).

Dentro de los polímeros biodegradables que se encuentran en desarrollo, los poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos (PHAs) y en particular el poli-( $\beta$ -hidroxibutirato-co- $\beta$ -hidroxivalerato) [P(HB-co-HV)] son de las más promisorios. Los PHAs tienen una amplia variedad de propiedades mecánicas útiles y son producidos a partir de fuentes renovables. Membranas a base de polietileno con almidón ya se encuentran comercialmente, si se lograra substituir la resina sintética dentro de estas membranas por PHA, podría obtenerse un producto el cual



sería más rápidamente biodegradable con propiedades termodinámicas útiles pero más económico que el PHA, ya que el almidón es un producto barato (\$ 0.35 dls por Kg.).

La biodegradabilidad de membranas con 100% de P(HB-co-HV) y otras con P(HB-co-HV) y 50% de almidón es probada a nivel de laboratorio y encuentran que un cultivo mixto requirió más de 20 días para degradar las muestras con 100% del polihidroxicanoato, mientras que muestras con 50% de almidón desaparecieron en menos de 8 días. La biodegradación ocurrió más rápidamente en condiciones aeróbicas que en anaeróbicas y ambos tipos de membranas presentaron propiedades mecánicas útiles. Concluyen que la adición de almidón a P(HB-co-HV) no solo reduce el costo del producto sino que origina un producto completamente biodegradable, cuya velocidad de biodegradación puede ser controlada ajustando la relación almidón-PHA (Bruce *et al*, 1993).

Copolímeros de polimetilacrilato con almidón fueron desarrollados y extruidos en forma de membrana mostrando excelente fuerza de tensión y elongación iniciales, estas muestras fueron expuestas al ataque de hongos como *Aspergillus niger* perdiendo más del 40% de su peso después de 22 días de incubación. El parámetro físico de fuerza de tensión y los estudios de microscopía electrónica de barrido indicaron una degradación substancial de la porción de almidón del copolímero (Dennenberq *et al*, 1978 ).

Una prueba para evaluar rápidamente la biodegradabilidad de plásticos a base de dos polihidroxicanoatos, (PHB-co-HV) y (PHB) fue desarrollada. La prueba consiste en placas con medio sólido con agar mezclado con suspensiones estables de glóbulos de 1- $\mu$ m de los polihidroxicanoatos, las cuales fueron inoculadas por punción con 7 diferentes cepas de

microorganismos. La medición de zonas claras se seleccionó como un valor medible. Encuentran que el copolímero (PHB-co-HV) fue degradado más rápido que el homopolímero (PHB). Esto probablemente como una consecuencia de la cristalinidad o propiedades estructurales de los polímeros (Kumagai *et al*, 1992).

Concluyen que la formación de la zona clara es considerado signo de biodegradación y que para que esta ocurra depende de varios requisitos como la excreción de exoenzimas, la difusión de estas al medio y la interacción de las mismas con el polímero (Augusta *et al*, 1993).

Recientemente, la posibilidad de producir PHA a gran escala y aun costo comparable a los plásticos sintéticos se ha alcanzado con la demostración de la producción de PHA en plantas transgénicas (Poirier *et al*, 1992).

Una revisión más reciente sobre la síntesis de PHA en bacterias y plantas es realizada donde se analiza las vías biosintéticas en bacterias, la producción comercial de estos compuestos por fermentación bacteriana y su producción en plantas transgénicas. Concluyen que el impacto de la producción de PHA utilizando plantas sería en la agricultura, ya que la diversificación de la agricultura a través de la producción de nuevos productos de valor industrial en cultivos podría contribuir significativamente a aliviar los problemas de sobreproducción y de subsidios por parte de los gobiernos en el mundo occidental (Poirier *et al*, 1995).

Estudios de ingeniería genética se han desarrollado para producir PHAs utilizando CO<sub>2</sub> como fuente de carbono a través de *Pseudomonas acidophila*, introduciendo el fragmento de ADN responsable de quimiolitotrofia de *Alcaligenes hydrogophilus*. El

desarrollo de un sistema de producción quimiofotoautotrófica de copolímeros de PHA a una escala industrial, utilizando CO<sub>2</sub>, además de la importancia de producir productos de interés comercial sería un nuevo método para reciclar el CO<sub>2</sub> (Yagi *et al*, 1996).

Las bacterias metilotróficas utilizan compuestos de un solo carbón como metanol para su crecimiento y tienen la propiedad de producir metabolitos útiles a partir de sustratos baratos como el metanol. La producción de P(3-Hidroxivalerato) asociada al crecimiento de bacterias metilotróficas como *Paracoccus denitrificans*, a partir de n-pentanol ha sido realizada encontrándose una acumulación del 22 al 24% del peso seco celular, y con propiedades físicas del polímero producido comparables a las de otros homo y copolímeros (Yamane *et al*, 1996).

Otro polímero que aunque no es natural es biodegradable es la policaprolactona (PCL), un poliéster sintético el cual se ha visto es degradado por un gran número de microorganismos, pero sus propiedades físicas no son muy deseables para muchas aplicaciones (Huang, 1995). El estudio para entender los mecanismos de degradación por enzimas microbianas de polímeros naturales y sintéticos, podría ser útil en el diseño de nuevos plásticos biodegradables. Así se han llevado a cabo estudios sobre la actividad degradadora de *Fusarium* sobre este poliéster, encontrándose una actividad de depolimerización a través de cutinasas (Murphy *et al*, 1996).

## **OTROS POLÍMEROS BIODEGRADABLES.-**

### **a) LIGNINA.-**

La lignina es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa, se encuentra en la pared celular de todas las plantas leñosas. Es un polímero con varias características estructurales y gran variedad de grupos funcionales que pueden reaccionar. Es la fuente natural más grande de poliaromáticos. Cerca de  $50 \times 10^6$  toneladas de lignina se liberan anualmente por la industria de la pulpa de madera.. El incremento de la utilización de lignina puede lograrse por la copolimerización de lignina con monómeros sintéticos (Glasser *et al*, 1989). La copolimerización de lignina con acrilamida e hidroximetilacrilato fue patentada por Meister en 1991 (Meister *et al*, 1991). La biodegradabilidad de copolímeros de lignina con poliestireno fue evaluada a través de hongos basidiomicetos blancos como *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y hongos cafés como *Geopphyllum trabeum*. Los hongos blancos degradaron las muestras de plásticos a una velocidad que se incrementaba conforme aumentaba el contenido de lignina en el copolímero, mientras que los hongos cafés no afectaron a ninguno de los plásticos, se observó que los hongos blancos secretan enzimas oxidativas asociadas con la degradación de lignina en el medio utilizado (Milstein *et al*, 1992).

#### b) QUITINA.-

En un estudio realizado en 1976 sobre el mercado de la quitina, la cantidad y costo de la producción en EUA a partir de desperdicios de crustáceos, así como de la demanda que podrían tener productos derivados de quitina a precios específicos, se concluye la

factibilidad comercial para producir entre 1 a 4 millones de libras de quitina-quitosan por año para ser vendida entre 1.0 y 2.5 dls por libra (Murray y Hattis, 1978).

Investigadores que estudian la capacidad de degradación de quitina y/o quitosan por microorganismos de suelo y agua, encuentran que una amplia variedad de microorganismos son capaces de degradar estos compuestos; algunos solo utilizan el quitosan mientras que otros degradan ambos compuestos (Fenton *et al*, 1978).

Una revisión sobre el potencial de la quitina para numerosas aplicaciones, se menciona que la quitina es un producto de desecho de la industria procesadora de alimentos del mar con una estimación de  $1.2 \times 10^5$  toneladas métricas por año a nivel mundial. (Knoor, 1991).

Además, se estima que los hongos podrían proveer de  $3.2 \times 10^4$  toneladas métricas de quitina anualmente y se espera que las ventas totales de quitina/quitosan alcancen 2 billones de dólares durante los próximos diez años. Ambos biopolímeros, quitina y quitosan, ofrecen un amplio rango de uso como purificadores de agua, aplicaciones farmacéuticas, cosméticos, alimentos y diversos usos biotecnológicos entre otros (Averbach, 1978; Knoor, 1991).

Una revisión más reciente, describe los estudios más actuales que se encuentran realizando diversos investigadores a nivel mundial sobre aplicaciones de la quitina o quitosan. Algunas de estas señalan el posible efecto de la quitina para estimular el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo humano; debido a su carga positiva el quitosan rápidamente se une a superficies con carga negativa, como cabello y piel lo que lo hace útil como ingrediente en cosméticos. También se ha estudiado su habilidad para

remover metales y aromáticos policíclicos, para eliminar el colesterol y grasas, para combatir infecciones y por último, experimentos realizados en la Universidad de Harvard, demuestran que el quitosan puede mantener el virus del SIDA unido a la superficie celular e interferir con la actividad de éste (Pennisi, 1993).

La Compañía Katokichi, Ltd., es una de las principales productoras de quitina/quitosan en Japón y apoya programas intensivos sobre la utilización de estos coloides.

La quitina es comúnmente encontrada en invertebrados marinos, insectos, hongos, etc., en forma conjugada con proteínas. Por ejemplo en carapacho de cangrejo, camarón y langosta contienen de 14 a 35 % de quitina en peso seco. Los hongos tienen cantidades considerablemente mayores; es decir, que más de cien millones de toneladas de quitina son anualmente producidas por estos animales y microorganismos en el mundo, pero la cantidad accesible anualmente de quitina se ha estimado en ciento cincuenta mil toneladas (Allan *et al*, 1978). En Japón, se ha estimado que cerca de 500 toneladas se fabrican anualmente, principalmente de carapacho de cangrejo, pero la cantidad exacta de producción no se ha reportado. De manera que muy poco uso se le ha dado a la quitina, es decir, que la quitina es el último recurso natural que permanece sin utilizarse en el siglo

Las aplicaciones generales de la quitina y el quitosan: derivados solubles de quitina, tales como la carboximetilquitina tiene propiedad de retener agua y se proyectan para usarse en acondicionadores para cabello u otros cosméticos. Oligosacáridos de quitina, como quitopentosas y quitohexosas, se ha reportado que tienen un efecto en inmuoestimulación. El quitosan también tiene propiedades para retener agua, En base a esta propiedad, ropa

deportiva que absorba fácilmente el sudor esta en el mercado. Efectos antibacterianos del quitosan son bien conocidos, mas aún el quitosan tiene propiedades hipercolesterolemicas y acelera el crecimiento en plantas. También se han elaborado membranas de quitosan por su capacidad para separar soluciones de alcohol-agua, utilizadas en la industria química (Tsugita, 1989).

Henri Bracannot fue el primero en describir a la quitina - el la llamo fungina- en 1821. La quitina no se disuelve en la mayoría de los solventes orgánicos como agua y alcohol. Está usualmente unida a proteínas. En 1859, un químico llamado Rouget encontró que calentando quitina en presencia de hidróxido de sodio concentrado la convierte a un compuesto relacionado pero mas útil llamado quitosan. Uno de los primeros usos de la quitina fue purificar agua obtenida del procesamiento de la industria pesquera, específicamente de mariscos. Estas plantas producen además del agua sólidos como carapachos y vísceras. Cerca del 85% del peso de cada animal es desechado, lo que origina cerca de 3 millones de toneladas de desechos sólidos cada año. Algunas de estas compañías usan la quitina derivada de sus desechos sólidos para purificar su agua. Un estudio en una planta ubicada en Louisiana en 1989, mostró que el quitosan obtenido de sus desperdicios pudo remover 98% de los sólidos suspendidos en el agua de desecho. La quitina y el quitosan son de hecho buenos agentes quelantes. Una industria Japonesa llamada Kurita vende el quitosan como un agente floculante. En Japón al menos 5 compañías fabrican quitina y quitosan a partir de carapacho de cangrejo. Chito-Bios de Ancona, Italia vende quitosan-N-carboxibutil, bajo el nombre de Evalsam<sup>®</sup>, para shampoos, jabones para baño, jabones líquidos, pasta de dientes, etc.

Varios países, incluyendo EUA, Japón, Noruega, Italia e India, tienen actualmente plantas productoras de quitina/quitosan a partir de moluscos. Lo poco que producen es usado para industria farmacéutica y para tratamiento de aguas residuales. No existen datos acerca de cuanta quitina teóricamente es disponible de la industria de crustáceos, pero de acuerdo a la FAO, en 1987, a nivel mundial serian 3.69 millones de toneladas de crustáceos y asumiendo que 1% del peso del crustáceo es quitina, asumimos 36 700 toneladas por año de quitina como desecho del procesamiento de camarón, langosta, cangrejo. El principal problema es que no es costeable económicamente hablando, el coleccionar estos desperdicios de varias pequeñas compañías procesadoras.

Al parecer la mayor fuente de quitina en el futuro podría ser por biotecnología mas que a partir de desechos del mar. Si la demanda se incrementara, los fabricantes podrían desarrollar microorganismos modificados genéticamente para producir estos compuestos. Ciertas algas producen quitina en forma de fibras extracelulares, que podrían ser del 10 al 15% de su peso seco y recuperase con un rendimiento del 80%. Quitina y sus derivados parecen ser útiles como plásticos muy versátiles. El quitosan podría tener uso en áreas donde membranas no tóxicas y fuertes se requieran, plásticos para microondas y para empacar comida. Algunos investigadores piensan que estos químicos podrían ser la base para plásticos biodegradables. El quitosan puede producirse en muchas presentaciones: polvo, pasta, solución, membranas, fibras (Stephen, 1991).

Un estudio sobre la permeabilidad de membranas elaboradas a partir de quitina hacia el agua y solutos, encuentra que las membranas elaboradas pueden ser potencialmente



utilizadas como membranas de osmosis inversa o en otras aplicaciones que requieran la separación de agua y solutos (Rutherford y Dunson, 1984).

En base a un análisis sobre el aporte y la demanda para productos a base de quitina en Estados Unidos, concluyen la factibilidad comercial para producir entre 1 y 4 millones de toneladas de quitina/quitosan por año para venderse a \$1.00 y \$2.50 por libra (Murray y Hattis, 1978).

Una amplia variedad de microorganismos en suelo y agua son capaces de degradar quitina y quitosan. Algunos degradan solamente el quitosan mientras que otros degradan ambos polisacáridos. Los microorganismos degradadores de quitina son extremadamente comunes en suelo (  $10^5$  UFC por g de suelo de jardín, bosque, y muestras de suelos agrícolas) (Fenton *et al*, 1978; Alexander, 1980).

La formación de membranas y fibras a partir de quitosan es dependiente de la estructura del quitosan que se utilice y este va a depender de la especie de crustáceo de la cual se obtenga. Así, Averbach, utilizando quitosan obtenido a partir de diversos crustáceos, obtuvo membranas flexibles y resistentes, con una fuerza de tensión de 20,000 psi y un porcentaje de elongación de 6%, a través de la técnica de moldeado, las cuales se desintegraron completamente en 3 a 4 semanas en el Atlántico Norte en las costas de Massachusetts (Averbach, 1978 ).

Actualmente las compañías procesadoras de alimentos del mar consideran sus subproductos como basura y los apilan en las líneas costeras alrededor del mundo por millones de toneladas. Sin embargo, en años recientes debido al incremento en salvaguardar el medio ambiente, una nueva generación de investigadores en Estados Unidos han

considerado a la quitina y el quitosan como compuestos potenciales debido a que no son tóxicos y son biodegradables (Pennisi, 1991).

La biodegradabilidad de la quitina es importante desde el punto de vista técnico, especialmente en relación a su uso como acarreador para drogas de liberación lenta, plaguicidas, y otras formulaciones. La bacteria *Serratia marsescens* y *Enterobacter liquefaciens* son 10 veces tan activas para degradar quitina como *Aspergillus fumigatus* y *Streptomyces*.

La producción de quitina y quitosan esta basada en caparazón de cangrejo y camarón de industrias ubicadas en Oregon, Washington, Virginia y Japón. Muchos países tienen grandes fuentes de crustáceos sin explotar como Noruega, México y Chile.

Para producir 1 Kg de quitosan 70% deacetilado, a partir de caparazón de camarón se requieren 6.3 Kg de HCl al 30% y 1.8 Kg de NH<sub>4</sub>OH. En 1984 el precio del quitosan a nivel mundial era de \$ 10.00/Kg.

La quitina y el quitosan tienen baja toxicidad, la LD<sub>50</sub> del quitosan en ratones de laboratorio es de 16 g/Kg de peso, cercana a la de sal y azúcar (McCarthy, 1989 ).

### c) PECTINA.-

En un estudio sobre la importancia de la producción de la pectina, se estima que la producción mundial de este producto es de 10,000 toneladas al año. (Fogarty y Ward 1972).

Los subproductos de la industrialización del limón y la manzana pueden ser utilizados para la obtención de pectina, se reporta que el contenido de este compuesto es de 3-4 % en la cáscara de limón y de 0.5 a 0.6 % en la cáscara de manzana. La tecnología de que se dispone actualmente puede colaborar en la solución del problema de aprovechamiento de desechos agroindustriales, en este caso sólidos provenientes de las industrias procesadoras de jugos, que actualmente, en países como México constituyen un factor muchas veces considerado de contaminación del entorno ecológico debido a que no existe una explotación total de estos residuos. Un fruto mexicano como lo es el tejocote, es reportado como una fuente para obtención de pectina con rendimientos equiparables al de la manzana. (Monroy *et al* 1990).

#### d) PULULAN.-

En membranas elaboradas con pululan y quitosan por el método de moldeado, comparan las propiedades físicas y funcionales como fuerza de tensión, flexibilidad y permeabilidad. Encuentran que estos polímeros presentaron mayor permeabilidad al oxígeno y resistencia que las membranas sintéticas como mylar y prolipropileno, sin embargo su fuerza de tensión y flexibilidad fueron considerablemente menores. (Mayer *et al* 1989).

Al estudiar la influencia de la concentración y el tipo de fuente de carbono, nitrógeno y fosfatos sobre el peso molecular y el rendimiento en la producción de pululan por *Aureobasylum* sp, investigadores encuentran que las membranas elaboradas con pululan de peso molecular bajo y medio tuvieron flexibilidad, elongación y fuerza de tensión similares,

mientras que las membranas elaboradas con pululan de alto peso molecular resultaron duras y quebradizas (Wiley *et al* 1993).

Biopolímeros como pululan y quitosan, tienen propiedades químicas, físicas y biológicas únicas que pueden proveer características funcionales mejoradas cuando se compara con polímeros sintéticos. Pululan ( un polímero lineal de maltotriosas), fue producido a partir del hongo *Aureobasidium pullulans* en tres rangos de peso molecular promedio variando las condiciones del proceso de fermentación. Quitosan (un polímero lineal de 2-amino-2 deoxy-D-glucosa con uniones  $\beta$ -1,4) derivado de desechos de carapacho de mariscos o de la pared celular del hongo *Mucor rouxii*, fue entrecruzado con epíclorohidrina durante el proceso de moldeado de las membranas.

Membranas moldeadas a partir de pululan y quitosan fueron evaluadas en cuanto a sus propiedades funcionales incluyendo fuerza de tensión, flexibilidad y permeabilidad al oxígeno. El pululan y quitosan sin derivatizar tuvieron mayor resistencia de permeabilidad al oxígeno comparado con membranas sintéticas usadas para empaque tales como el mylar y el polipropileno; sin embargo, su fuerza de tensión y flexibilidad fueron considerablemente menores que las dos membranas sintéticas. La fuerza de tensión del quitosan entrecruzado fue de 2 a 3 ordenes de magnitud mayor que el quitosan sin derivatizar y alcanzó la fuerza de tensión del mylar y el polipropileno (Mayer *et al*, 1989).

Pululan es un biopolímero, el cual es liberado al medio de cultivo como un metabolito secundario por el hongo dimórfico *Aureobasidium pullulans*. Biopolímeros como pululan ofrecen un numero de potenciales ventajas sobre polímeros sintéticos. Esto incluye propiedades físicas y químicas, tales como la formación de membranas transparentes

con baja permeabilidad al gas, buenas propiedades adhesivas, biodegradabilidad, excelentes características de fuerza y flexibilidad, compatibilidad biológica, potencial para manipulación genética, control sobre características poliméricas, y una habilidad para producir fracciones de peso molecular definido y valor nutricional. En conclusión, la aprobación puede ser fácil de obtener debido a la fuente natural de estos materiales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### A) Elaboración de los plásticos:

Se utilizó el método semiseco de Otey, el cual consiste en reemplazar de 10 a 15 % de los sólidos secos en las diferentes formulaciones por urea, agregando un total de líquidos de 8.1 % de agua y 8.1 % de hidróxido de amonio concentrado.

Para la preparación de los formulados se utilizaron los siguientes componentes:

- Almidón de maíz perla; 9.7% de humedad ( Buffalo 3401 )
- Quitina ( de carapacho de cangrejo; 7.5% de humedad ) ( Sigma Chemical Co. )
- Pectina ( cáscara de cítricos; 7.4% de humedad ) ( Sigma Chemical Co. )
- Pululan ( de *Aureobasidium pullulans*; 7.4% de humedad ) ( Sigma Chemical Co. )
- Polietileno de baja densidad ( PEBD; Chemplex 3404B )
- Copolímero de etileno y ácido acrílico, 20% ( EAA; Primacor 5981 )
- Urea (grado analítico) ( Sigma Chemical Co. )
- Hidróxido de amonio concentrado
- Polietilenglicol ( Sigma Chemical Co. )
- Agua

A los formulados se les asignó la letra "F" y la numeración del 1 al 10 resaltando cinco diferentes grupos en base al contenido del polisacárido:

Grupo 1: F1, F2, y F6 los cuales contienen únicamente almidón como polisacárido.

Grupo 2: F3 y F7, almidón y quitina.

Grupo 3: F4, almidón y pululan.

Grupo 4: F5 y F8, almidón y pectina.

Grupo 5: F9 y F10, correspondiente a los controles con 100% de PEBD y 100% de EAA, respectivamente.

El contenido de humedad de los diferentes polisacáridos (almidón, quitina, pectina, y pululan) se determinó pesando 10 g de cada uno de ellos en una balanza para medir humedad marca Mettler, a 105° C por 15 min.

Una vez determinada la humedad se procedió a pesar los componentes para obtener un volumen final de 300 g de cada formulado con las siguientes concentraciones finales:

#### Composicion quimica de los diferentes formulados.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
ALMIDON	40%	40%	20%	20%	40%	36.4%	18.2%	36.4%		
UREA	10%	10%	10%	10%	10%	9.1%	9.1%	9.1%		
EAA	25%	50%	25%	25%	25%	45.5%	22.7%	22.7%		100%
PEBD	25%		25%	25%			22.7%		100%	
QUITINA			20%				18.2%			
PULULAN				20%						
PECTINA					25%			22.7%		
PPG						9.1	9.1	9.1		
AGUA	8	8	8	8	8	8	8	8		
NH <sub>4</sub> OH	8	8	8	8	8	8	8	8		

Nota: los valores de agua e hidróxido de amonio corresponden a 8 partes por cada 100 partes de sólidos.

Se reporta en la literatura que la adición de pequeñas cantidades de alcali son esenciales para obtener una membrana de calidad, y el hidróxido de amonio es utilizado debido a que cualquier exceso se pierde rápidamente durante el proceso de extrusión.

La urea se agrega para reducir la cantidad de agua y tiempo necesario para la gelatinización del almidón (Otey y Doane, 1987).

El polietilenglicol se adicionó como plastificante para ver si su presencia modificaba los niveles de biodegradación o ayudaba en las propiedades físico-mecánicas de las membranas plásticas obtenidas.

Una vez incorporados todos los ingredientes se procedió a mezclarlos en una batidora de acero inoxidable (Hobart Mixer) hasta obtener un polvo homogéneamente humedecido. Este polvo fue extruido en un extrusor (C. W. Brabender Plasticorder, Mod. PC 200) de tornillo simple (1.9 cm. diámetro 20/1 L/D), a través de un dado tipo spaghetti con orificios de (17 1.6 mm.) a temperaturas de 120-130°C. Generalmente se requirió de 2 a 3 pases a través del extrusor hasta obtener el contenido de humedad deseado (5-10%).

Diferentes temperaturas y velocidades fueron probadas previamente hasta encontrar las condiciones a las cuales se logró obtener membranas con características deseadas.

Una vez obtenidas las membranas plásticas de los diferentes formulados se determinaron los parámetros de porcentaje de elongación y fuerza de tensión (ASTM-D882-81), procediéndose posteriormente a realizar las pruebas de biodegradabilidad en los diferentes sistemas.



## **B) Pruebas de Biodegradabilidad:**

### **i) Pruebas de Laboratorio.**

#### **a) Microorganismos:**

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron: un consorcio bacteriano altamente amilolítico denominado LD-76 proporcionado por el Centro Nacional para la Utilización de la Investigación en Agricultura, ARS/USDA/NCAUR, Peoria, Illinois; y una cepa de *Serratia marscesens* obtenida del Laboratorio de Bacteriología Básica del Dpto. de Microbiología e Inmunología de la Fac. de C. Biológicas de la U.A.N.L.

#### **b) Mantenimiento de las cepas:**

Las cepas fueron activadas en caldo nutritivo y mantenidas por medio de resiembras periódicas en tubos con agar nutritivo, pH 7.0 en refrigeración a 4 °C.

#### **c) Inóculo:**

A partir de los cultivos en agar nutritivo se tomaron dos asadas y se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo nutritivo. Después de 18 h de incubación en agitación en un agitador Lab-Line a 150 rpm y 30 °C, se tomaron 2 ml y se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad los cuales contenían 100 ml del medio de cultivo denominado 838 modificado, el cual consiste en una mezcla de sales y vitaminas:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4 g.;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 g.;  $\text{MgCl}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g.;  $\text{NaCl}$ , 0.1 g.;  $\text{CaCl}$ , 0.02 g.;  $\text{FeCl}_3$ , 0.01 g.;  $\text{NaMo}$ , 0.002 g.;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.5 g.; Solución Vitamínica, 1.5 g.; Agua Destilada 1000 ml.; pH  $7.3 \pm 0.1$  (Mary Kinney, comunicación personal ); y las muestras obtenidas de los formulados.

#### **d) Preparación de las Muestras:**

A partir de las membranas plásticas elaboradas se cortaron tiras de 1.0 X 10.0 cm. aproximadamente, cada tira fue numerada y pesada en una balanza analítica (Sartorius  $\pm 0.001$  g) para obtener el peso inicial de las tiras. Estas se esterilizaron por inmersión durante 30 min. en una solución de peróxido de hidrógeno al 3%; posteriormente se lavaron cuidadosamente en condiciones asépticas con agua destilada estéril. Se colocaron 6 tiras en cada matraz con el medio de sales y el inóculo sumando un total de 6 matraces para cada formulado a probar. Estos matraces se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  y 125 rpm. Un matraz de cada muestra se recuperó a los 5, 15, 30, y 45 días de incubación.

#### **e) Determinación de Pérdida en Peso:**

Las tiras recuperadas de cada matraz se lavaron cuidadosamente en agua destilada varias veces y se secaron por un período de 5 días a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Posteriormente se determinó su peso en una balanza analítica (Sartorius  $\pm 0.001$  g) para obtener el peso final. El porcentaje de pérdida en peso se obtuvo restando el peso final al peso inicial de cada tira multiplicando por 100. Cada tira fue considerada una repetición, teniendo 10 tratamientos con 6 repeticiones.

Después de ser obtenidos los datos de pérdida en peso, las tiras se utilizaron para medir los otros parámetros.

**f) Determinación de crecimiento microbiano:**

Este parámetro se midió por medio de cuenta viable en placa al inicio del experimento y en cada fecha de colecta. Se prepararon diluciones decimales del medio de cultivo y se sembraron en placas de Petri con Agar Nutritivo, para cada formulado, respectivamente.

**g) Determinación de porcentaje de Elongación y Fuerza de Tensión:**

Las tiras recuperadas se analizaron para determinar los cambios en los parámetros físico-mecánicos de porcentaje de elongación y la fuerza de tensión en un Instron Universal Testing Machine Modelo 4201, Instron Corp., Canton, MA., de acuerdo al método estándar para medir propiedades tensiles en plásticos delgados en forma laminar (ASTM-D 882-81) a los diferentes tiempos de incubación, comparado con los valores obtenidos de estos parámetros de las membranas después de ser elaboradas. Se utilizó una mordaza de 10 mm de longitud, una distancia entre las mordazas de 50.8 mm, y una velocidad de 50 mm/min. Las mediciones se realizaron a una temperatura de 25°C y 50% de humedad relativa.

**h) Análisis por Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (IRTF):**

Las tiras recuperadas, además de sus controles respectivos fueron analizadas por el método de pastillas de KBr. Se pesaron 2.66 mg de las muestras respectivamente, y se congelaron en nitrógeno líquido en viales de acero inoxidable (Wig-L-bug) los cuales contenían dos pelotas de acero inoxidable para ayudar a la trituración. Los viales se agitaron en un por 60 seg., este procedimiento se repitió tres veces hasta lograr obtener un polvo fino. Posteriormente se agregó KBr (Sigma Chem.) grado espectrofotométrico previamente deshidratado, hasta obtener 700 mg de peso total agitándose de nuevo por 30 seg. para homogenizar la muestra. Se tomaron 300 mg de la mezcla para pasarse a la prensa hidráulica aplicándose 20000 libras de presión a vacío para obtener la pastilla. Se procedió a analizar la pastilla en un espectrofotómetro Láser Precisión Analytical, Modelo RFX-75.

Cada uno de los espectros obtenidos son el resultado de un promedio de 32 barridos con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Espectros de los polisacáridos (almidón, quitina, pectina y pululan), de los polímeros sintéticos (PEBD y EAA), así como de las membranas de los formulados antes y después de ser expuestas a los estudios de biodegradación, fueron obtenidos para observar cambios de los picos de absorción característicos de cada uno de los componentes en las diferentes membranas plásticas elaboradas.

## **ii) Pruebas en Ecosistemas Naturales.**

### **1) Río:**

#### **a) Lugar de Prueba:**

Sistema acuático en movimiento, río de 1.5 mts. de profundidad aproximadamente, ubicado en el Parque Zoológico "La Pastora" al sureste de la ciudad (Monterrey, NL); este

lugar fue seleccionado en base a dos aspectos, el primero por la cercanía de dicha localidad al laboratorio donde se realizaron las pruebas microbiológicas y el control sobre el acceso al público en dicha área; y el segundo en base a la apreciación donde se observó que una gran cantidad de los desechos plásticos que no son manejados en algún sistema de recolección de basura, llegan como punto final a este tipo de sistemas acuáticos.

#### **b) Preparación de las Muestras:**

Se cortaron 18 cuadros de 5.0 cm<sup>2</sup> de cada una de las membranas plásticas elaboradas, se enumeraron y pesaron respectivamente. Cada uno de los cuadros se colocó en forma de emparedado dentro de rejillas de plástico de 7.0 cm<sup>2</sup> debidamente aseguradas y marcadas para evitar la pérdida de la muestra. Posteriormente se colocó una rejilla de cada muestra en canastas de plástico sumando un total de 3 canastas por cada fecha de colecta, esto es 3 repeticiones. Las canastas fueron colectadas a los 10,24,38,48 y 60 días y colocadas dentro de una bolsa de plástico grande la cual contenía agua del río para evitar la deshidratación durante el transporte al laboratorio para los análisis. Al mismo tiempo se colectó agua en un frasco estéril para llevar a cabo un seguimiento de las condiciones ambientales del lugar como temperatura y pH del agua, así como el análisis microbiológico de la misma.

#### **c) Determinación de Pérdida en Peso:**

De las tres repeticiones obtenidas de las muestras en cada fecha de colecta, dos de ellas se utilizaron para determinar el parámetro de pérdida en peso. Las muestras se

recuperaron de las rejillas de plástico y se lavaron cuidadosamente, dejándose secar a temperatura ambiente (25°C), por 5 días. Posteriormente se determinó el peso final y el porcentaje de pérdida en peso.

**d) Análisis por Espectroscopía de Infrarrojo (IR):**

Las muestras recuperadas del análisis de pérdida en peso se utilizaron para el análisis de espectrofotometría de Infrarrojo por el método de pastilla en KBr, antes mencionado.

**e) Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido:**

La tercer repetición de cada formulación se cortó en dos partes, una de ellas fue fijada en glutaraldehído al 1% para el análisis de microscopía electrónica de barrido, de esta una porción pequeña (0.5 cm<sup>2</sup>), correspondiente a cada muestra se deshidrato por 10 min. en cada una de las soluciones de etanol al 50,60,70,90 y 100 %. Se montaron en portamuestras de aluminio y se cubrieron con una mezcla de oro-paladio para posteriormente analizarse en un microscopio JOEL, Mod. 1200 EX. La parte restante se utilizó para el análisis de flora microbiana adherida a la muestra.

**f) Análisis de Flora Microbiana adherida a la muestra:**

Se cortó cuidadosamente 1 cm<sup>2</sup> de cada muestra y se colocó en 9 ml de solución salina estéril 0.85%, realizándose diluciones decimales para posteriormente sembrarse en cajas Petri con agar nutritivo las cuales fueron incubadas a 37°C por 24-48 h.

## **2) Suelo:**

### **a) Lugar de Prueba:**

Área de jardín, ubicada en la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. Este lugar se eligió nuevamente debido a la cercanía con el Laboratorio y al control sobre el acceso al público.

### **b) Preparación de las muestras:**

Se cortaron 3 tiras de 10 cm de largo por 1.0 cm de ancho de cada muestra plástica, se tomó el peso inicial de estas y se enumeraron. Cada juego de tres repeticiones se colocaron en pozos en el suelo a una profundidad de 30 cm y una distancia de 30 cm entre pozo y pozo. Las muestras se recuperaron a los 15,30,45,60,75,90,105,120 días de exposición. Al mismo tiempo se tomaron muestras de suelo para determinar la temperatura y humedad del suelo en cada fecha de colecta y se realizó un análisis fisicoquímico del suelo para su caracterización.

### **c) Determinación de Pérdida en Peso:**

Las tiras recuperadas se limpiaron cuidadosamente con la ayuda de un pincel para quitar el exceso de tierra en el caso de muestras en donde no hubo mucha adhesión de tierra; o utilizando un baño de ultrasonido en muestras difíciles de limpiar. Posteriormente se lavaron y se dejaron secar por 5 días a temperatura ambiente (25°C), tomándose el peso final de las mismas para obtener el porcentaje de pérdida en peso.

**d) Determinación de pH:**

Se pesaron 10 g de suelo y se adicionaron 25 ml de agua destilada pH 7.0, se mezcló hasta homogenizar la muestra y se dejó reposar por 30 min., posteriormente se determinó el pH en un Potenciometro Beckman Mod. 63.

**e) Determinación de Humedad:**

Se pesaron 10 g de suelo y se procedió a determinar su contenido de humedad en base a diferencia de peso después de 24 h a 100 ° C, en una estufa marca MAPSA modelo HIDP-334.

**f) Determinación de Porcentaje de Elongación y Fuerza de Tensión:** Se procedió como se indicó anteriormente.

**g) Análisis de Espectroscopia de Infrarrojo (IR):** Se procedió como se indicó anteriormente.

**C) Análisis Estadístico:**

Para el análisis estadístico se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA), y prueba de comparación de Rango Múltiple de Tuckey.



## **RESULTADOS**

### **ELABORACION DE MEMBRANAS.-**

Se prepararon un total de 10 diferentes formulados, para obtener las membranas plásticas por el método de extrusión. Las propiedades fisico-mecánicas que presentaron estas membranas después de ser obtenidas se describen en la (Tabla 3).

Los resultados se describen siguiendo los parametros utilizados para medir la biodegradabilidad de las muestras para simplificar el manejo de los datos obtenidos evitando la repeticion de graficas y tablas.

### **PERDIDA EN PESO.-**

El análisis de pérdida en peso de las membranas expuestas al consorcio bacteriano LD-76 en laboratorio indicó mayor pérdida en peso en los formulados a base de pectina del grupo 4, en donde F5 alcanzó un 44.26 % de pérdida en peso y F8 un 42.71% a los 45 días de exposición (Fig 1). El segundo grupo en presentar mayor pérdida fue el grupo 1 de almidón, con valores de 24.58, 21.78 y 11.57% para F6, F1 y F2, respectivamente, a los 30 días de exposición (Fig 2). Posteriormente en los formulados con quitina del grupo 2, el formulado F7 alcanzó un 17.23 % a los 30 días, mientras que F3 presentó 13.61% en el mismo período (Fig. 3). Puede observarse que en los grupos correspondientes a los

controles F9 y F10 se obtuvieron valores de + 0.582 (lo que indicó ganancia de peso) y 2.36%, respectivamente.

Los datos también se graficaron en base a los valores de diferencia de peso promedio obtenidos de las repeticiones de cada fecha de colecta para cada formulado (Fig 4) y de todos los formulados para cada día (Fig 5). El análisis estadístico de estos datos indicó una alta diferencia significativa entre los formulados ( $F = 208.51$ ; gl. 8,3;  $P < 0.01$ ) y los días ( $F = 164.97$ ; gl. 8,3;  $P < 0.01$ ), respecto a la diferencia de peso promedio, donde la interacción de ambos factores (tipo de formulado y días), también indicó una alta diferencia significativa ( $F = 27.29$ ; gl. 8,3;  $P < 0.01$ ). Sin embargo, cuando se prueban cada factor por separado respecto a la diferencia de peso promedio, los días no presentan diferencia significativa, por lo que este factor no puede analizarse independiente del tipo de formulado para la variable en estudio ( $F = 2.07$ ; gl. 3;  $P > 0.05$ ), (Tabla 4) ; mientras que el factor formulado sigue siendo altamente significativo ( $F = 24.96$ ; gl. 8;  $P < 0.01$ ), (Tabla 5).

En el experimento de laboratorio con *Serratia marcescens*, el grupo de pectina (4), presentó el mayor porcentaje de pérdida en peso con 72.86% a los 90 días para el F5 y 65.94% para F8 a los 45 días (Fig 6). El grupo de almidón (2), presentó un 41.31% para F1 a los 45 días de exposición, valor que posteriormente decrece significativamente. F2 presentó la mayor pérdida en peso el día 90 con 7.81% (Fig 7). Para el grupo de quitina (2), un 14.38% se presentó a los 90 días para F3 y 26.82% para F7 a los 75 días (Fig.8). Los valores de diferencia de peso promedio para cada formulado en las diferentes fechas de colecta, así como la diferencia de peso promedio que se presentó en cada día independientemente del formulado, se observan en la (Fig. 9 y Fig 10).

Se observó una alta diferencia significativa en la diferencia de peso promedio entre los formulados ( $F = 52.01$ ; gl. 8,5;  $P < 0.01$ ) y entre los días ( $F = 3.19$ ; gl. 8,5;  $P < 0.01$ ); con una interacción en ambos factores altamente significativa ( $F = 37.27$ ; gl. 8,5;  $P < 0.01$ ), sin embargo cuando se analizan los factores individualmente se encuentra que no existe diferencia significativa en la diferencia de peso promedio respecto a los días ( $F = 2.44$ ; gl. 5;  $P > 0.05$ ), en tanto que el factor formulado sigue presentando una alta diferencia significativa ( $F = 53.71$ ; gl. 8;  $P < 0.01$ ) (Tablas 6 y 7).

Se incluyeron controles negativos para los experimentos de laboratorio los cuales consistieron en colocar muestras de los diferentes formulados en el medio de cultivo sin microorganismos, se pudo observar pérdida de peso en los diferentes formulados con valores promedio de 10.58% para F2 y 13.7% para F6 del grupo de almidón (2); 10.41 y 19.19% para F3 y F7 del grupo de quitina (2), respectivamente; 28.36% para F5 y 36.99% para F8 del grupo de pectina (4); no presentándose pérdida en peso para los controles F9 con 0.82% y 0.95% para F10 (Tabla 8).

Los resultados obtenidos en Río, también mostraron al grupo de pectina (4) como el grupo con los formulados que presentaron mayor pérdida en peso: 71.92% para F8 y 67.25% para F5, a los 62 días de exposición (Fig 11). Posteriormente el grupo de pululan (3), con el formulado F4 presentó 44.07% de pérdida en peso a los 62 días, (Fig. 12), seguido del grupo de almidón (1), con 35.85, 16.22 y 9.28%, para F1, F6 y F2, respectivamente (Fig. 13). El grupo de quitina (2), obtuvo 31.66% para F7 y 22.64% para F3 en el mismo período de tiempo (Fig. 14). Los formulados correspondientes a los controles F9 y F10 no mostraron pérdida en peso después del período de exposición.

El análisis estadístico indicó una alta diferencia significativa en la diferencia de peso promedio entre los formulados ( $F = 25.92$ ; gl. 8,5;  $P < 0.01$ ), así como entre los días ( $F = 28.96$ ; gl. 8,5;  $P < 0.01$ ) no encontrándose diferencia significativa en la interacción de ambos factores ( $F = 1.60$ ; gl. 8,5;  $P > 0.05$ ). Cuando se analizan los factores individualmente con respecto a la variable diferencia de peso los formulados siguen presentando diferencia altamente significativa ( $F = 25.25$ ; gl. 8;  $P < 0.01$ ), y similar a los experimentos anteriores el factor días no presenta diferencia significativa ( $F = 0.2109$ ; gl. 1;  $P > 0.05$ ).

El análisis del agua mostró condiciones de pH neutro (7.57), una temperatura promedio de 22.4° C y una flora microbiana predominantemente bacilar, con un promedio de  $47.05 \times 10^2$  células por ml (Tabla 9).

En el experimento realizado en Suelo en el período Enero a Mayo 1994, no se recuperaron las muestras correspondientes a todas las fechas de colecta para la mayoría de los formulados. Así tenemos que para F1 del grupo 1 de almidón, todas las repeticiones se recuperaban en pequeños trozos o casi completamente desintegradas (Tabla 10). Estos resultados representados en diferencia de peso se muestran en la (Tabla 11). Se encontró una alta diferencia significativa en la diferencia de peso respecto a los formulados ( $F = 44.30$ ; gl. 6,7;  $P < 0.01$ ) y respecto a los días ( $F = 83.03$ ; gl. 6,7;  $P < 0.01$ ) así como en la interacción de ambos factores ( $F = 4.64$ ; gl. 6,7;  $P < 0.01$ ); similar a los experimentos anteriores cuando el factor días es analizado individualmente no presenta significancia sobre la diferencia de peso ( $F = 1.873$ ; gl. 7;  $P > 0.05$ ) y el factor formulado mantiene su alta diferencia significativa ( $F = 72.33$ ; gl. 6;  $P < 0.01$ ).

En el experimento de suelo realizado en el período de Octubre de 1994 a Enero de 1995, el número de muestras recuperadas fue mínimo en la mayoría de los formulados (Tabla 12), por lo que el análisis estadístico para el parámetro de pérdida en peso no pudo realizarse.

El análisis fisicoquímico del suelo indicó un suelo de tipo franco arcilloso, (Tabla 13), con un pH predominantemente neutro y un contenido de humedad variable (Tabla 14 y 15). La temperatura promedio del suelo tomada al azar de 6 diferentes puntos, fue incrementándose de 20,6° C para el mes de Febrero a 33,5° C en el mes de Mayo (Tabla 16).

#### **DETERMINACION DE CRECIMIENTO MICROBIANO.-**

La prueba para determinar población microbiana en los experimentos de laboratorio con el consorcio bacteriano LD-76 y *Serratia marscesens*, indicó un incremento en el número de microorganismos durante el tiempo que duraron los experimentos, excepto en los controles F9 y F10. Se observó que el número máximo de microorganismos se alcanzó a los 30 días, disminuyendo posteriormente. En el caso de *Serratia marscesens* se presentaron fluctuaciones en el número de células por ml de medio de cultivo, en las diferentes fechas de colecta de las muestras (Tabla 17 y 18).

## **ANALISIS DE FLORA MICROBIANA ADHERIDA A LA MUESTRA.-**

En los experimentos realizados en río y suelo se observó la flora adherida a la muestra. En el experimento de río el mayor número de microorganismos por  $\text{cm}^2$  de muestra se presentó en las muestras de quitina, seguido de pectina, almidón y pululan y el menor número se presentó en los controles F9 y F10. En el experimento de suelo realizado de Enero a Mayo'94 se observó el mismo patrón excepto con pululan el cual no fue recuperado. En Octubre'94 a Enero'95, nuevamente los formulados con quitina presentaron el mayor número de microorganismos adheridos, seguido en este caso por almidón y finalmente pectina (Tabla 19, 20 y 21).

## **DETERMINACION DE PARAMETROS FISICOS DE LAS MEMBRANAS.-**

En el grupo de almidón (1), el porciento de elongación después de 45 días de exposición en el laboratorio al consorcio LD-76, disminuyó para los tres formulados con una disminución del 90.88% para F1, 70.44% para F2 y 54.22% para F6. En el grupo de quitina (2), este parámetro también declinó con un 83.58% para F3 y 69.72% para F7. Sin embargo en el grupo de pectina (4), F5 presentó un aumento en el % de elongación de 37.78%, mientras que F8 tuvo un decremento del 81.27%. Los controles F9 y F10 también presentaron cambios en este parámetro, un incremento del 66.13% para F9 y un decremento del 19.08% para F10 (Fig. 15,16,17).

La fuerza de tensión en la mayoría de los formulados se vió incrementada; en el grupo de almidón (1), solo se vió disminuida en F1 con 2.98%, mientras que F2 y F6 tuvieron incrementos de 119.15% y 194.79%, respectivamente. Para el grupo de quitina (2), F3 disminuyó en 13.53% y F7 aumentó en 188.36%. Los formulados F5 y F8 correspondientes al grupo de pectina (4), ambos presentaron incremento en la fuerza de tensión con un 12.73% y 284.11%, respectivamente. En el caso de los controles F9 tuvo un pequeño incremento del 1.17% y F10 una disminución del 23.06% (Fig.18,19,20).

Para los experimentos realizados en suelo, en el período de Enero a Mayo de 1994 el porcentaje de elongación disminuyó para todos los formulados excepto para los controles F9 y F10, donde se vió incrementada con 51.63 y 88.62%, respectivamente. Así tenemos que en el grupo de almidón (1) F6 presentó una disminución de 95.63%, seguido de F2 con 95.18%; en el grupo de quitina (2), F3 presentó un decremento del 76.85% y F7 de 75.91%; para el grupo de pectina (4), F5 mostró una disminución del % de elongación del 122.10%, mientras que F8 alcanzó 94.61% (Fig. 21,22,23).

El parámetro de fuerza de tensión, para el grupo de almidón (1), tuvo un incremento para ambos formulados F2 y F6 con 42.43 y 31.86%, respectivamente; en el grupo de quitina (2) sin embargo, solamente F7 tuvo un incremento del 38.15% y F3 disminuyó en 25.03%; para el grupo de pectina (4), ambos formulados presentaron disminución con 82.91 y 59.54% para F5 y F8, respectivamente. Los controles disminuyeron con 20.14% para F9 y 33.89% para F10. (Fig. 24,25,26).

En el experimento realizado en el período de Octubre'94 a Enero'95, el porcentaje de elongación para el grupo de almidón (1) disminuyó para todos los formulados con 96.93,

96.01 y 88.42% para F1,F2 y F6, respectivamente. En el grupo de quitina (2), también se vió disminución con 77.58% para F3 y 61.21% para F7; en el grupo de pululan (3) F4 disminuyó con 93.05%; el grupo de pectina (4), F5 mostró un ligero incremento de 7.25%, mientras que F8 disminuyó en 79.39%. Nuevamente los controles incrementaron su elongación en 35.60 y 95.91% para F9 y F10, respectivamente (Fig. 27,28,29). El parámetro de fuerza de tensión se vió disminuido para todos los formulados de los diferentes grupos: para el grupo de almidón (1), F1 con 79.74%, F6 con 54.88% y F2 con 8.52%; el grupo de quitina (2), F3 con 72.80% y F7 con 4.80%; en el grupo de pululan (3) F4 disminuyó en 93.27%; el grupo de pectina (4), F8 con 93.16 y F5 con 90.72%; los controles F9 con 43.47% y F10 con 51.84% (Fig. 30,31,32).

#### **MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.-**

En el análisis de microscopía electrónica de barrido efectuado en las muestras obtenidas del experimento de Río después de 62 días, se puede observar que únicamente los formulados elaborados con polímeros sintéticos mezclados con los diferentes polímeros naturales exhiben un deterioro considerable en su superficie así como una notable acumulación de organismos. El análisis microbiológico de estas poblaciones no mostró diferencia en cuanto al tipo de microorganismos predominando las bacterias sobre las algas, protozoarios y diatomeas (Fig. 33).



## ESPECTROFOTOMETRIA DE INFRARROJO.-

Los espectros de infrarrojo de los controles F9 y F10 elaborados con 100% de PEBD y EAA, respectivamente, se muestran en la (Fig. 34). Se puede observar en el espectro de PEBD (Fig. 34 A), bandas estrechas de absorción características de los enlaces C-H a 2851 y 2921  $\text{cm}^{-1}$ , una banda delgada correspondiente al mismo tipo de enlace a 1468  $\text{cm}^{-1}$ ; además de una pequeña banda a 721  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de EAA, (Fig. 34 B), fue muy similar al de PEBD con excepción de una banda estrecha de absorción a 1705  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al enlace C=O, y algunas bandas menores en la región de la huella digital. Los espectros correspondientes a estos formulados después de exponerse a los diferentes sistemas de estudio se muestran en la (Fig. 34 C,D,E,F,G,H), donde se puede observar que no se presentó ningún cambio esencial en las bandas características de estos polímeros después de los diferentes períodos de estudio.

Los espectros de los polímeros naturales utilizados para la formulación de las diferentes membranas se muestran en la (Fig. 35). El almidón, presentó una banda de absorción amplia correspondiente al grupo OH a 3400  $\text{cm}^{-1}$ , una banda menor a 2921  $\text{cm}^{-1}$ , y un juego de bandas de absorción fuerte, característico del grupo C-O, entre 960 y 1190  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 35 A). La quitina, además de presentar la banda de absorción del grupo OH y las bandas de absorción en la región de la huella digital correspondiente al grupo C-O, presentó una banda de absorción a 1654  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo amida I (Fig. 35 B). La pectina mostró la banda de absorción característica del grupo C-O a 1023  $\text{cm}^{-1}$ , del grupo

OH a  $3400\text{ cm}^{-1}$  y para el grupo COOH a  $1746\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 35 C). En el caso del pululan presentó un espectro muy similar al almidón (Fig. 35 D).

La (Fig. 36 A, 37 A, y 38 A), muestran los espectros de los formulados F1, F2 y F6 del Grupo de almidón (1), antes de haber sido expuestos a los diferentes sistemas de estudio. En los tres formulados podemos observar la banda amplia de absorción correspondiente al grupo OH alrededor de los  $3400\text{ cm}^{-1}$  misma que se observó en los espectros de los polímeros naturales, las bandas estrechas del grupo C-O a  $2851$  y  $2921\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los polímeros sintéticos y el juego de bandas de absorción en la región de la huella digital entre  $960$  y  $1190\text{ cm}^{-1}$ , del grupo C-O que también se observaron en los polímeros naturales. Los espectros posteriores a los tratamientos en los diferentes ecosistemas indicaron para F1, una disminución en la absorbancia de las bandas correspondientes a los grupos OH y C-O (Fig. 36 B,C,D,E). Se pudo observar que para este formulado así como para F2 (Fig. 37 B,C,D,E) y para F6 (Fig. 38 B,C,D,E), la disminución de absorción fue mayor en los experimentos de suelo seguido por el ecosistema de río y finalmente en laboratorio. En el caso del grupo de quitina (2), se midió la disminución en la absorción de los tres grupos característicos OH, C-O y el grupo amida I (Fig. 39 a,b). Para F3 la disminución de absorción en los tres grupos característicos fue mayor en el experimento de río, presentándose una disminución menor en el grupo amida característico de la quitina. Para F7 la disminución fue mayor en el experimento de suelo realizado en Octubre'94 a Enero'95 seguido del experimento de río, posteriormente el otro experimento de suelo de Enero a Mayo'95 y finalmente en laboratorio, esto para los grupos OH y C-O, en el caso del grupo amida I la disminución de la absorción fue en descenso del

laboratorio, río y por último los dos experimentos de suelo (Fig. 39 C,D,E,F,G,H,I,J). El formulado F4 correspondiente al grupo de pululan (3), se pudo observar que para el experimento de río la disminución de absorción fue mayor para los grupos OH y C-O y en menor proporción para el grupo COOH (Fig. 40). Por último, para el grupo de pectina (4), los mayores cambios se presentaron en F8, (Fig. 41 A,B), sin embargo en ambos formulados (F5 y F8) se presentó una disminución mayor en el experimento de río seguido de los experimentos en suelo y finalmente en laboratorio para los grupos OH y C-O, observándose en general una disminución en la absorción menor para todos los ecosistemas en el grupo COOH (Fig. 41 C,D,E,F,G,H,I,J). El análisis cuantitativo con los valores en porcentaje de la disminución en la absorción de los principales grupos químicos para cada formulado se indica en la (Tabla 22).

### **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN ESTADO SÓLIDO.-**

Los estudios de resonancia magnética nuclear realizados a un formulado de cada grupo antes y después de 62 días de exposición en río, se muestran en la (Fig. 42 A,B), para F1, en la (Fig. 43 A,B), para F3 y en la (Fig. 44 A,B), para F5. Se pudo observar como se mantiene sin cambios la banda de 31 ppm, la cual corresponde a los grupos alifáticos metoxilos presentes en los polímeros sintéticos. Por otro lado, podemos observar la disminución en el área del pico a las 72 ppm que esta dada por los carbonos C2,C3,C5 y C4 de los grupos piranosil presente en los polímeros naturales. Se estimó la cantidad de carbohidrato perdido obteniendo la proporción de las áreas a 72 y 31 ppm de las muestras

correspondiente a los experimentos y comparando dicha proporción con el valor absoluto del contenido de carbohidrato inicial en las formulaciones, valor que nos indicó la cantidad de carbohidrato sin metabolizar y que nos permitió hacer una estimación del grado de biodegradación (Tabla 23).

**Tabla 1.- Costo aproximado de los polímeros biodegradables y niveles de producción en 1993.**

Polímero	Costo (dls. por lb.)	Nivel de Producción (lb. por año) <sup>a</sup>	Principal Modo de Producción
Almidón	0.15-0.8	> 230 billones	Biomasa de plantas
Acetato de Celulosa	1.70	2.3-2.4 billones	Conversión química, biomasa de plantas
PHBV	6.00-8.00	660 000	Fermentación bacteriana
Polivinilalcohol	1.50-2.50	150-200 millones	Síntesis química
Policaprolactona	2.70	< 10 millones	Síntesis química
Acido poliláctico	1.00-3.00	10 millones	Polimerización química

<sup>a</sup> Representa el nivel de producción total, no indicando que se utilizará para materiales biodegradables.

Nota: Tomada de Mayer y Kaplan, (1994)

**Tabla 2.- Compañías Productoras de Polímeros Biodegradables.**

Compañía	Tecnología (características)	Estatus comercial (capacidad)
Uni-Star Industries, Ltd. Star Kore	Copolímeros de almidón. Velocidad de degradación ajustable.	Disponibilidad comercial limitada Estimada en 100 millones para 1996. Costo dls. (0.75-1.25/lb)
Novon Product Group	Biopolímeros de almidón. Propietarios de su tecnología.	Disponibilidad comercial desde 1991. 100 millones lb./año. Costo dls. (1.50-3.00/lb)
Novamont	Biopolímeros de almidón	Comercialmente disponible. 5 millones lb./año. Costo dls. (1.60-2.50 lb/año)
Cargill	Polímeros de ácido láctico	En desarrollo. Planta piloto en operación desde 1991. Costo estimado dls. (1-3/lb.)
EcoChem	Resinas de ácido poliláctico	En desarrollo. Comercialización proyectada para 1995 con 100 millones lb./ año. Costo estimado dls. ( menos de 2.00)
Ecostar International	Polímeros de almidón	Comercialmente disponible desde 1991. 10 millones lb./año. Costo dls. (1.30-1.60)
Unión Carbide Corp.	Policaprolactona	Comercialmente disponible desde 1975. 10 millones lb./año. Costo dls (2.70/lb.)
Air Products and Chemicals, Inc.	Polivinilalcohol	Comercialmente disponible desde 1991. 150-200 millones lb./año. Costo dls. (1.50-2.50)
ICI Americas, Inc.	PHBV	Comercialmente disponible desde 1992. 660 000 lb./año. Costo dls. (8-10).

Nota: Tomada de McCarthy-Bates (1993)

**Tabla 3.- Propiedades Físico-mecánicas de las 10 membranas plásticas formuladas.**

FORMULADO	MODULO DE YOUNG <sup>a</sup>	% DE ELONGACION	FUERZA DE TENSION <sup>b</sup>	ESPESOR PROMEDIO <sup>c</sup>
F1	126.10	84.57	8.42	0.1064
F2	90.85	90.15	6.64	0.1052
F3	133.4	9.79	5.06	0.6220
F4	367.1	57.60	11.03	0.1145
F5	916.1	6.70	17.98	0.1001
F6	36.08	98.23	5.63	0.0438
F7	65	11.86	3.07	0.4373
F8	143.60	44.55	6.06	0.0512
F9	231.2	201.4	15.30	0.0297
F10	136.4	234.8	17.73	0.0531

<sup>a</sup> MPa ; <sup>b</sup> Mpa ; <sup>c</sup> mm.

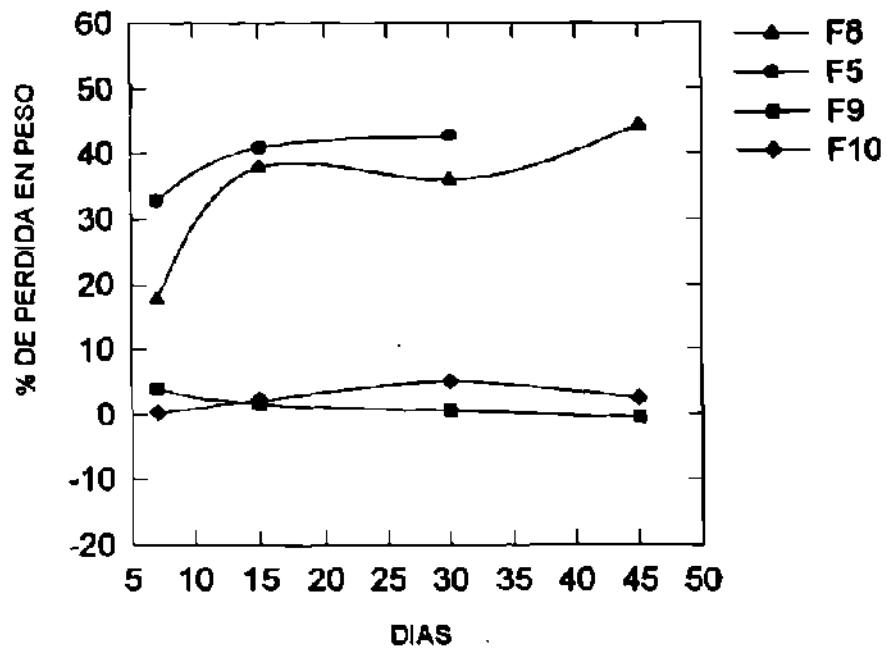


Fig. 1 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 4 expuestas al consorcio LD-76 en laboratorio por 45 días.

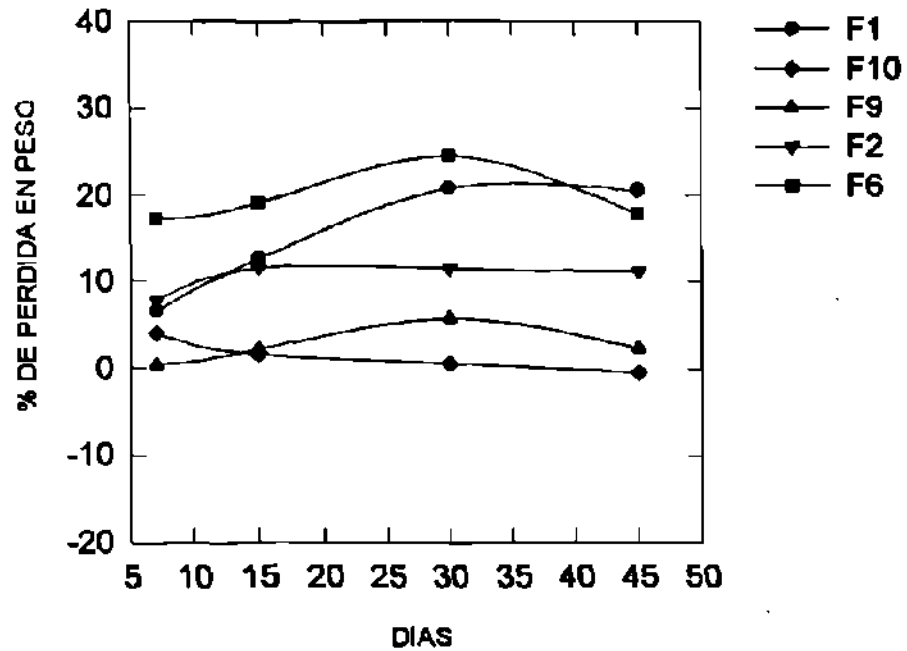


Fig. 2 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 1 expuestas al consorcio LD-76 en laboratorio por 45 días.



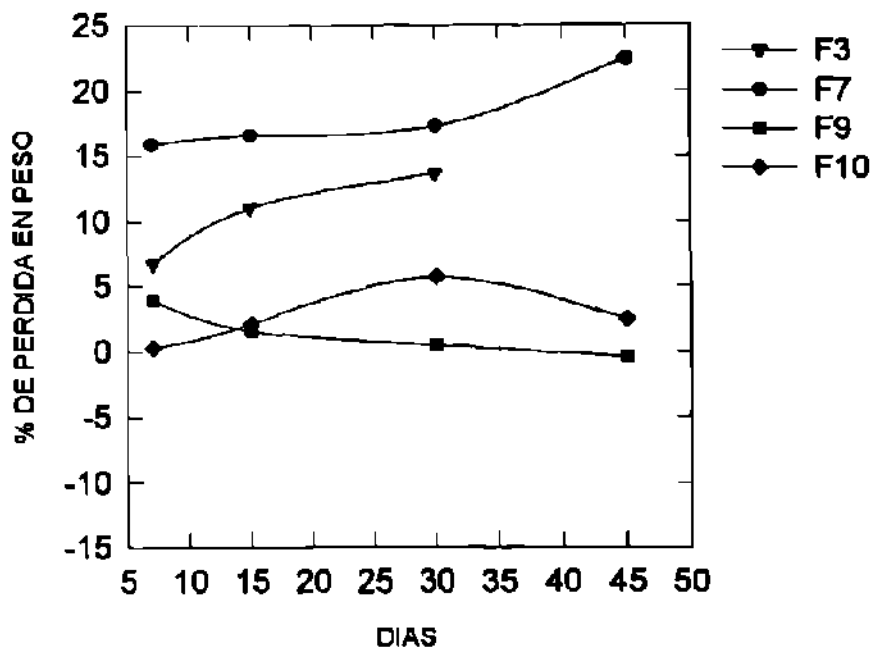


Fig. 3 Porcentaje de pérdida en peso en membranas del grupo 2 expuestas al consorcio LD-76 en laboratorio por 45 días.

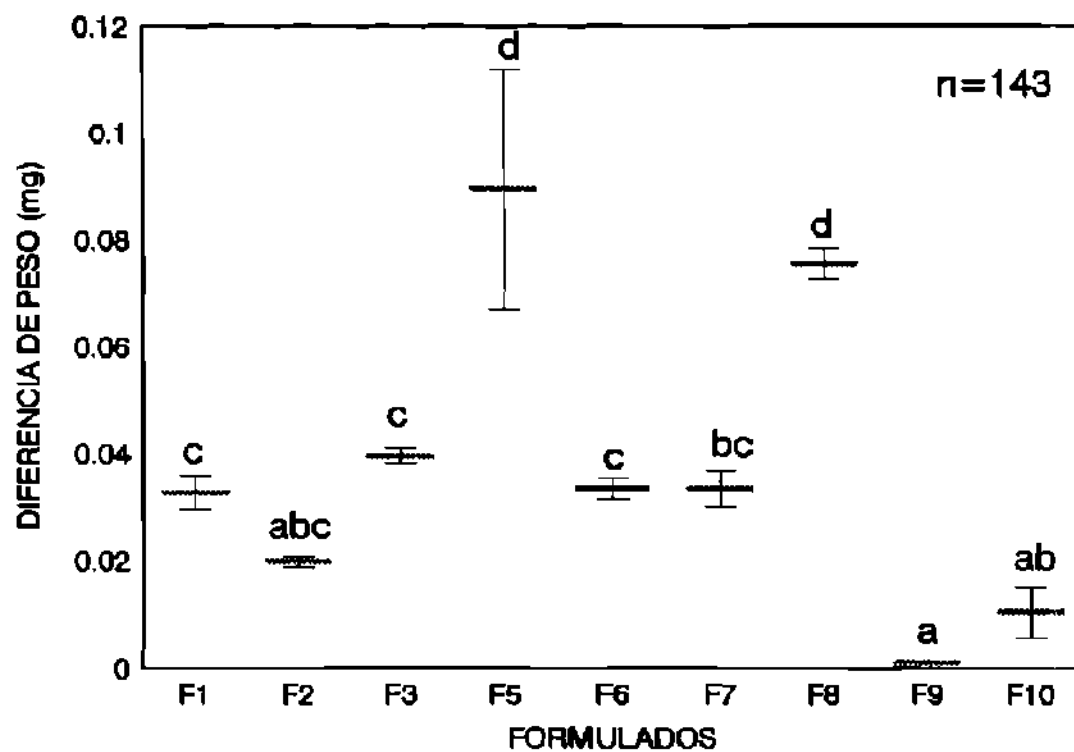
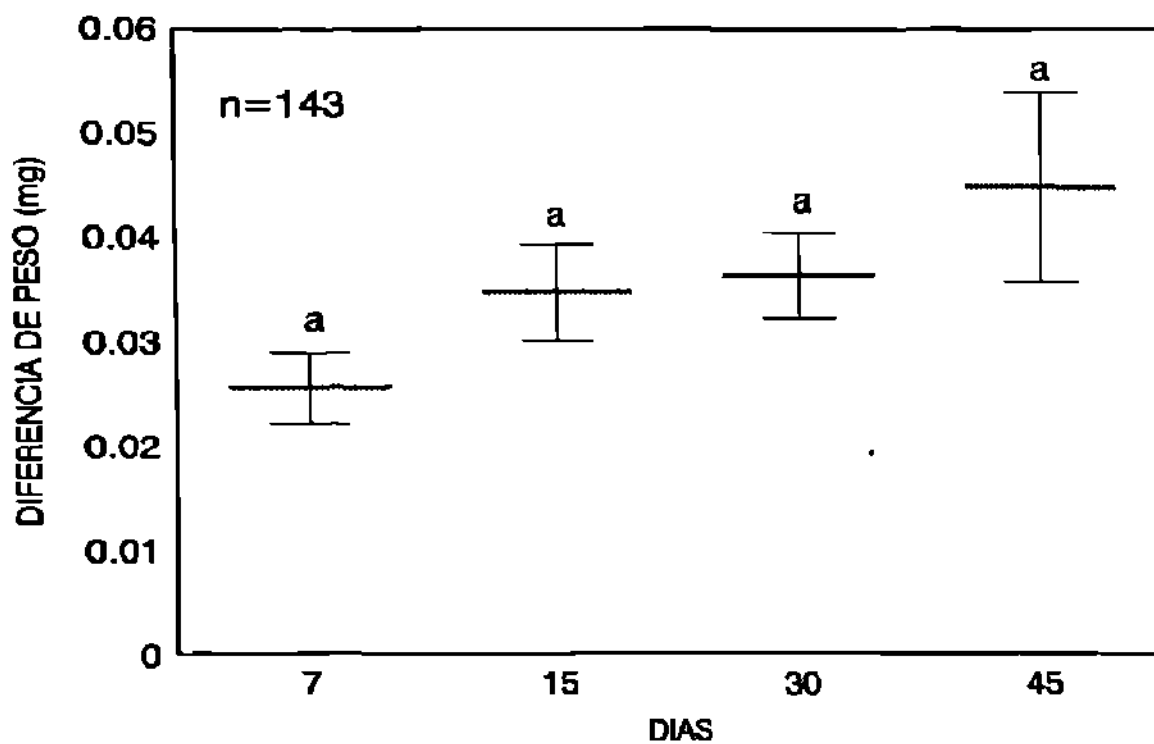


Fig. 4 Diferencia de Peso de los formulados durante el experimento de laboratorio con el consorcio LD-76.



**Fig. 5** Diferencia de Peso en las fechas de colecta del experimento en laboratorio con el consorcio LD-76 en los diferentes formulados.

**Tabla 4.- Diferencia de Peso Promedio con respecto al peso inicial de todos los formulados en las diferentes fechas de colecta, expuestos al consorcio bacteriano LD-76.**

<b>DIAS</b>	<b>MEDIA ± EE (mg) <sup>a</sup> *</b>
7	0.0256 ± 0.0034 a
15	0.0347 ± 0.0045 a
30	0.0363 ± 0.0041 a
45	0.0448 ± 0.0091a

<sup>a</sup> Los datos representan la diferencia de peso promedio de todos los formulados, n = 6

\* Letras iguales no son diferentes significativamente (P = 0.05 ) ( Prueba de Tukey)

**Tabla 5.- Diferencia de Peso promedio respecto al peso inicial de los formulados después de 45 días de exposición al consorcio bacteriano LD-76.**

<b>FORMULADO</b>	<b>MEDIA ± EE (mg) <sup>a</sup> *</b>
F1	0.0328 ± 0.0032 c
F2	0.0198 ± 0.0009 abc
F3	0.0395 ± 0.0014 c
F5	0.0895 ± 0.0225 d
F6	0.0335 ± 0.0020 c
F7	0.0335 ± 0.0033 bc
F8	0.0756 ± 0.0029 d
F9	0.0011 ± 0.0003 a
F10	0.0104 ± 0.0047 ab

<sup>a</sup> Los datos representan la diferencia en peso promedio de todas las fechas de colecta; n = 6

\* Letras iguales no son diferentes significativamente (P = 0.05) (Prueba de Tukey)

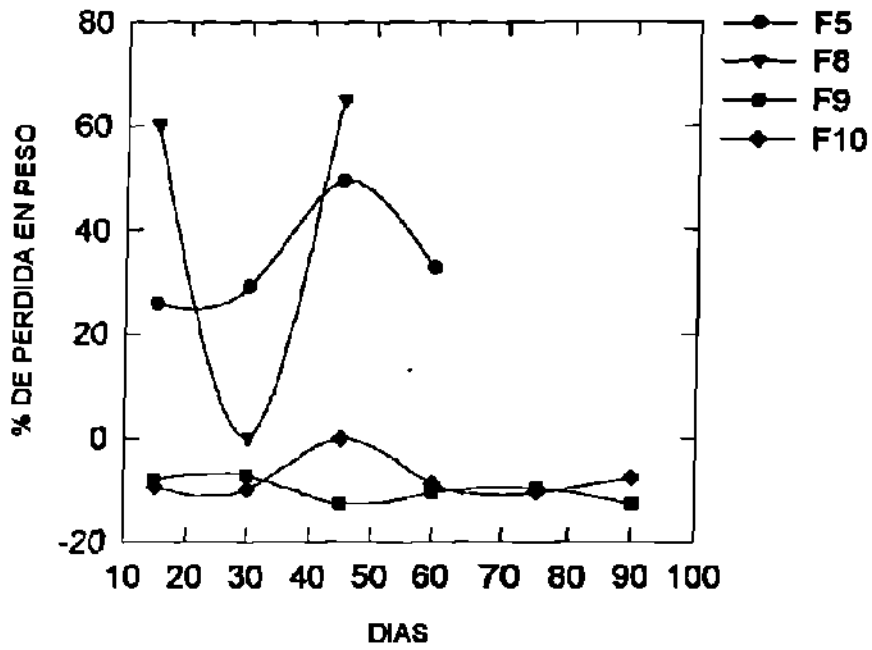


Fig. 6 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 4 expuestas a *Serratia marcescens* en laboratorio por 45 días.

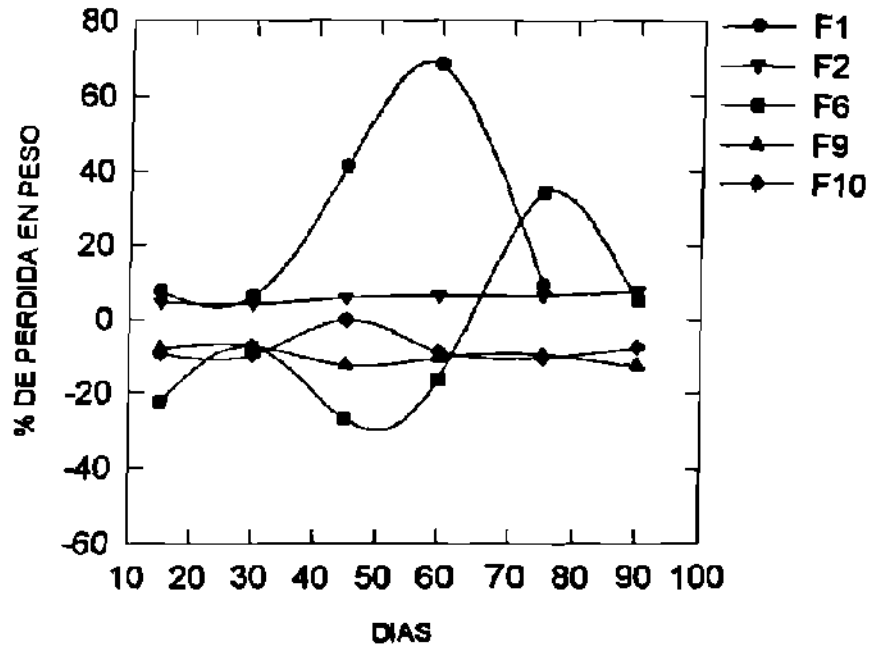


Fig. 7 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 1 expuestas a *Serratia marcescens* en laboratorio por 45 días.

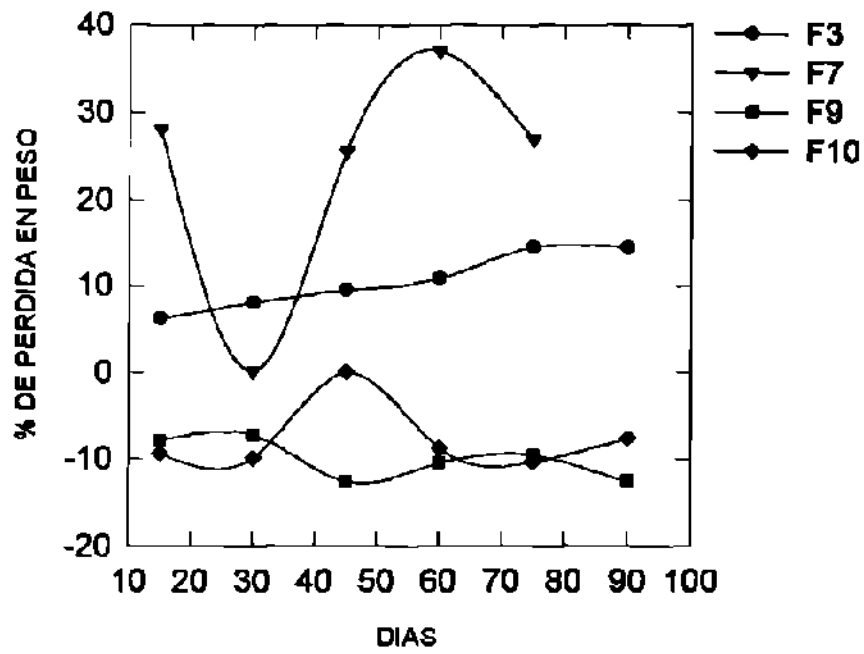
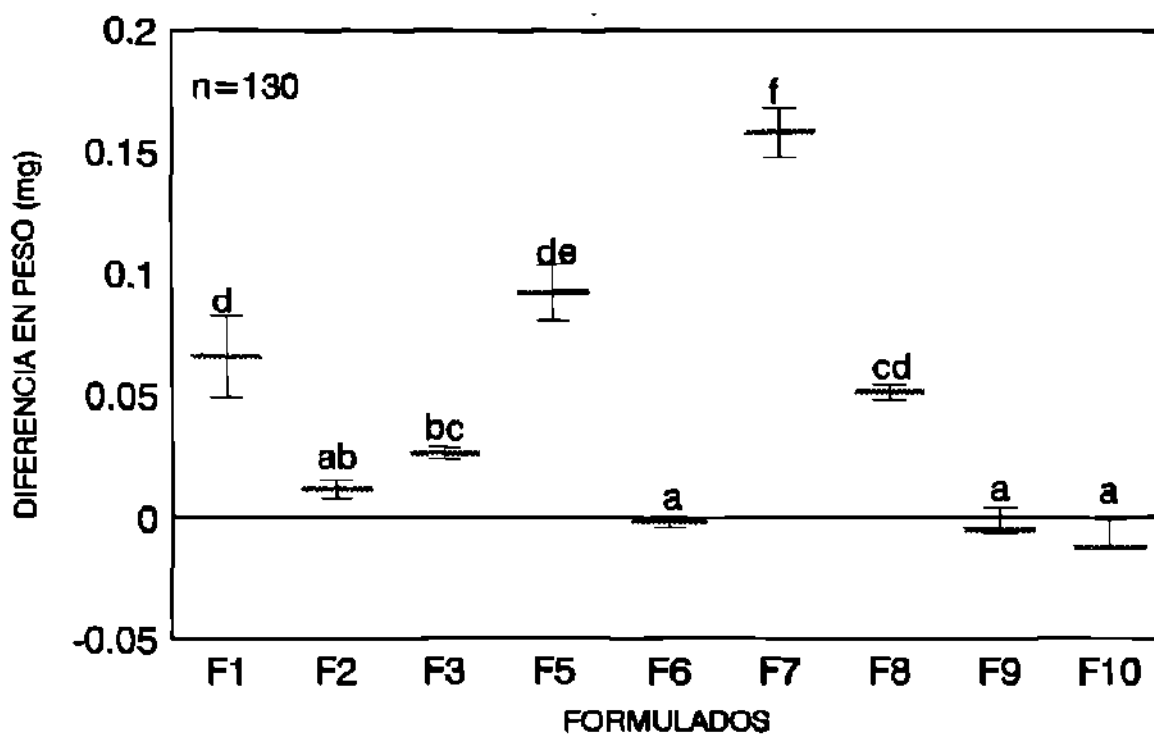


Fig. 8 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 2 expuestas a *Serratia marcescens* en laboratorio por 45 días.



**Fig. 9** Diferencia de Peso de los formulados durante el experimento de laboratorio con *Serratia marcescens*

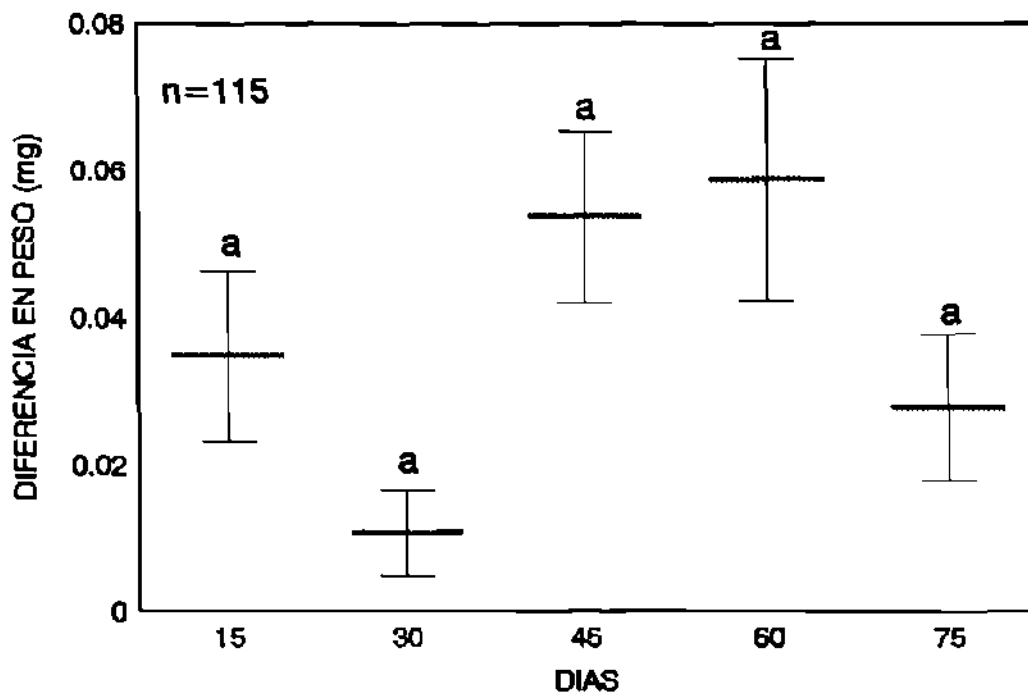


Fig. 10 Diferencia de Peso en las fechas de colecta del experimento en laboratorio con *Serratia marcescens* en los diferentes formulados.



**Tabla 6.-** Diferencia en Peso promedio con respecto al peso inicial de los formulados en las diferentes fechas de colecta expuestos a *Serratia marscesens*.

DIA	MEDIA $\pm$ EE (mg) <sup>a</sup> *
15	0.0348 $\pm$ 0.0116 a
30	0.0106 $\pm$ 0.0058 a
45	0.0537 $\pm$ 0.0117 a
60	0.0587 $\pm$ 0.0164 a
75	0.0277 $\pm$ 0.0099 a

<sup>a</sup> Los datos representan la diferencia de peso promedio de todos los formulados; n = 3

\* Letras iguales no son diferentes significativamente (P = 0.05) (Prueba de Tukey).

**Tabla 7.-** Diferencia de Peso promedio respecto al peso inicial de los formulados después de 90 días de exposición a *Serratia marscesens*.

FORMULADO	MEDIA $\pm$ EE (mg) <sup>a</sup> *
F1	0.0658 $\pm$ 0.0167 bc
F2	0.0116 $\pm$ 0.0037 ab
F3	0.0264 $\pm$ 0.0025 b
F5	0.0923 $\pm$ 0.0117 c
F6	-0.0017 $\pm$ 0.0022 a
F7	0.1583 $\pm$ 0.0100 cd
F8	0.0513 $\pm$ 0.0031 b
F9	-0.0052 $\pm$ 0.0012 a
F10	-0.0125 $\pm$ 0.0003 a

<sup>a</sup> Los datos representan la diferencia en peso promedio de todas las fechas de colecta; n = 3

\* Letras iguales no son diferentes significativamente (P = 0.05) (Prueba de Tukey).

**Tabla 8.- Por ciento de pérdida en peso de los formulados en agitación en el medio de cultivo sin inóculo.<sup>a</sup>**

Día	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
15	ND	2.51	6.73	ND	20.12	10.87	9.45	23.85	0.82	0.92
30	ND	1.79	5.43	ND	20.85	9.42	8.99	25.19	0.09	1.09
45	ND	3.15	3.99	ND	23.63	6.31	9.45	ND	0.06	0.85

<sup>a</sup> Los datos representan el promedio de 3 repeticiones.

ND = No determinado.

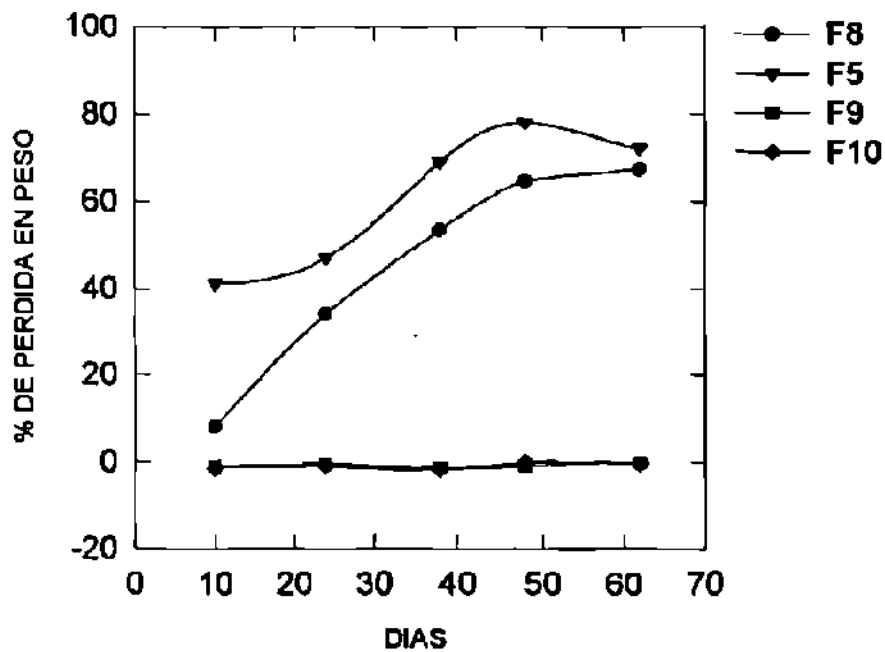


Fig. 11 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 4 después de 62 días de exposición en río.

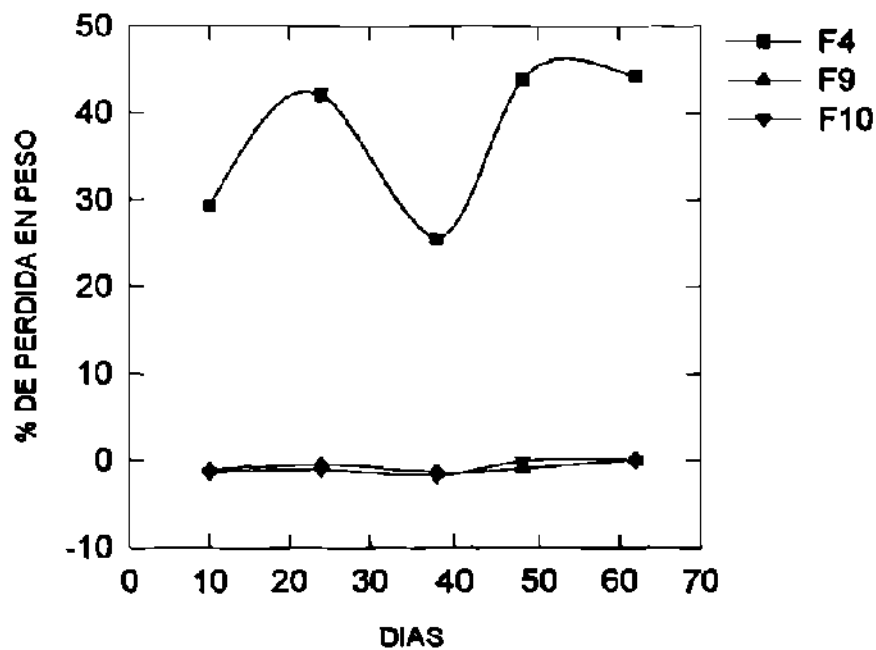


Fig. 12 Por ciento de pérdida en peso en membrana del grupo 3 después de 62 días de exposición en río.

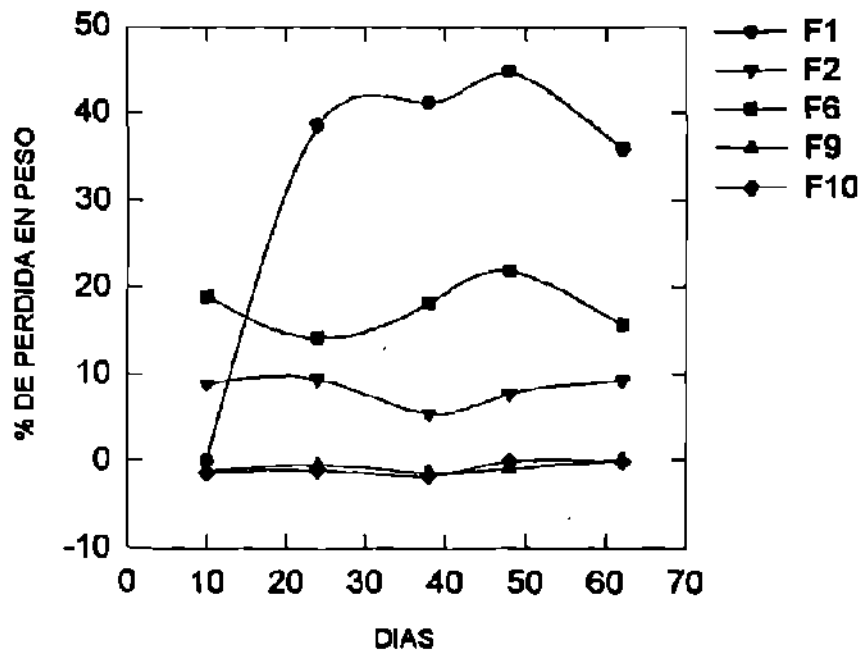


Fig. 13 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 1 después de 62 días de exposición en río.

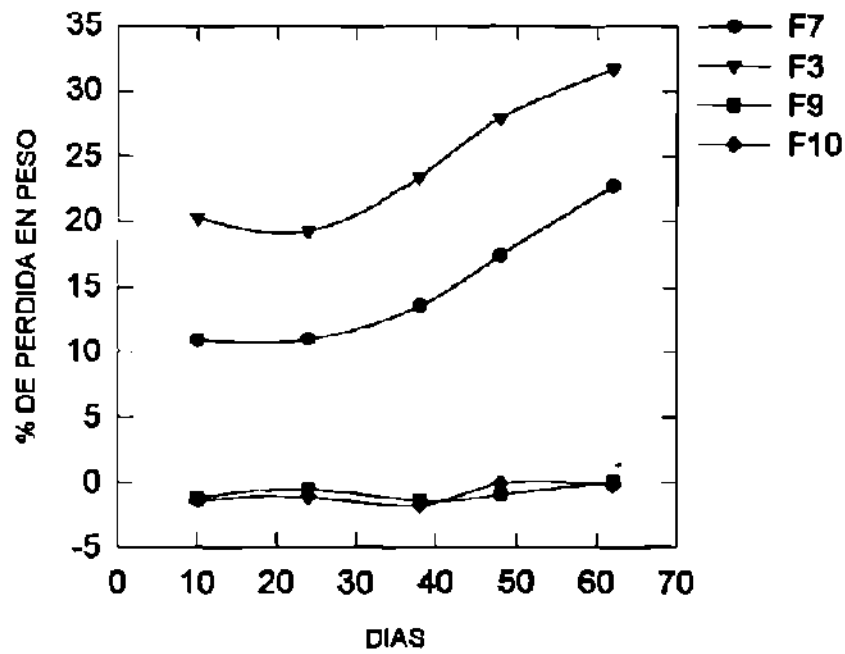


Fig. 14 Por ciento de pérdida en peso en membranas del grupo 2 después de 62 días de exposición en río.

**Tabla 9.- Análisis de pH, temperatura y número de microorganismos presentes en las muestras de agua en las diferentes fechas de colecta en el experimento en Río.**

Día de Colecta	pH	° C	# de microorganismos
10	7.63	24	$3.5 \times 10^2$
24	7.4	24	$7.7 \times 10^2$
38	7.32	20	$1.75 \times 10^3$
48	7.76	20	$2.55 \times 10^3$
62	7.71	24	$1.37 \times 10^4$

**Tabla 10.- Porcentaje de pérdida en peso de los formulados después de 120 días de exposición en suelo de jardín (Período Enero - Mayo '94).<sup>a</sup>**

Días	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
15	*	2.99	14.89	*	*	29.29	22.22	*	+4.24	+1.1
30	*	9.4	25.68	*	*	64.28	32.34	30.97	+0.005	+0.002
45	*	26.18	27.20	*	*	35.31	29.48	*	+4.21	+1.47
57	*	*	33.50	*	*	40.49	36.42	*	+6.05	+1.93
78	*	13.35	*	*	*	*	42.65	*	+5.62	+2.86
90	*	10.7	38.89	*	54.60	*	*	*	+3.85	+0.82
105	*	12.55	*	*	*	*	*	*	0.38	+1.43
120	*	13.33	47.96	*	*	*	44.67	73.74	+4.5	*

<sup>a</sup> Los datos representan el promedio de 3 repeticiones.

\* Muestras no recuperadas en condiciones para esta prueba.

**Tabla 11.- Diferencia en Peso promedio de los formulados en las diferentes fechas de colecta, colocados en suelo de jardín durante 120 días (Período Enero - Mayo '94).<sup>a</sup>**

FORMULADO	MEDIA $\pm$ EE (mg) <sup>a</sup> *
F2	0.0068 $\pm$ 0.0009 a
F3	0.0917 $\pm$ 0.0033 d
F5	0.0172 $\pm$ 0.0020 b
F6	0.0063 $\pm$ 0.0027 a
F7	0.0332 $\pm$ 0.0021 c
F8	0.0368 $\pm$ 0.0034 c
F9	0.0028 $\pm$ 0.0005 a

<sup>a</sup> Los datos representan la diferencia de peso promedio de todas las fechas de colecta; n = 3

\*Letras iguales no son diferentes significativamente (P=0.05) (Prueba de Tukey).

**Tabla 12.- Porcentaje de pérdida en peso de los formulados después de 120 días de exposición en suelo de jardín (Período Octubre'94 - Enero'95).<sup>a</sup>**

Días	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
15	*	42.85	18.09	*	63.45	41.91	30.73	*	*	ND
30	*	44.97	40.02	*	*	39.69	39.53	61.34	0.35	ND
45	*	*	*	*	*	57.54	45.25	69.29	0.95	ND
60	*	*	52.80	*	68.16	50.94	47.53	*	1.07	ND
75	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ND
90	*	*	40.28	*	*	50.22	39.81	80.22	0.45	ND
105	*	*	*	*	*	*	*	79.91	1.09	ND
120	44.34	28.85	39.81	*	53.07	52.14	45.31	*	*	ND

<sup>a</sup> Los datos representan el promedio de 3 repeticiones.

\* Muestras no recuperadas en condiciones para esta prueba.

ND = No determinado.

**Tabla 13.- Análisis Físicoquímico del suelo de jardín, ubicado en la Fac. C. Biológicas, U.A.N.L.**

CO <sub>3</sub>	0 meq/l.		
Ca	6.5 meq/l.		
Mg	11.5 meq/l.		
Cl <sub>2</sub>	12.5 meq/l.		
pH	7.7		
C.E.	0.5 mmhos		
Densidad	1.516		
M.O.	6.9%		
% Nitrogeno	0.336		
Textura:	Arcilla:	Limo:	Arena:
	38.92	25.08	36.0

**Tabla 14.- Valores de pH del suelo de jardín de las diferentes fechas de colecta de los formulados (Período Enero - Mayo'94).**

Días	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
15	7.64	7.70	7.74	7.79	7.60	7.75	7.72	7.69	7.65	7.59
30	7.58	7.69	7.53	7.58	7.81	7.60	7.54	7.67	7.90	7.69
45	7.37	7.54	7.54	7.53	7.52	7.48	7.43	7.50	7.52	8.07
57	7.95	8.09	8.12	8.24	8.15	8.26	8.27	8.30	8.16	8.30
78	7.60	7.87	7.97	7.94	7.92	7.85	7.82	7.87	7.43	7.46
90	7.86	7.90	7.88	7.81	7.94	7.88	7.81	7.93	7.94	7.85
105	7.84	7.79	7.84	7.86	7.78	7.74	7.62	7.76	7.86	7.93
120	7.31	7.36	7.36	7.57	7.90	7.47	7.55	7.52	7.65	7.61

**Tabla 15.- Contenido de Humedad del suelo de jardín correspondiente a las diferentes fechas de colecta para los formulados (Período Enero - Mayo'94).**

Día	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
15	5.61	4.11	4	5.8	4.9	ND	5	2.5	1.33	1.96
30	3.69	4.89	3.54	3.51	3.74	4.04	8.26	1.67	1.79	1.61
45	6.03	5.91	4.96	3.05	3.55	3.67	2.72	1.27	1.34	1.41
57	7.20	7.31	7.75	6.76	6.71	6.10	7.92	3.32	2.32	2.69
78	5.61	6.13	6.12	6.11	4.85	6.69	2.81	2.10	1.31	2.30
90	3.62	4.33	6.13	5.19	4.70	4.85	1.6	0.84	0.90	1.15
105	3.81	4.52	5.88	5.41	6.98	4.10	3.87	1.68	2.63	0.96
120	1.71	0.986	5.88	4.54	ND	6.20	2.04	1.05	0.655	0.578

ND = No determinado



**Tabla16.- Valores de temperatura promedio del suelo de jardín (Período Enero - Mayo'94).**

MES	Temperatura (°C)
Enero	20.7
Marzo	25.7
Abril	32.6
Mayo	33.5

**Tabla 17.- Número de microorganismos recuperados del medio de cultivo en el experimento de laboratorio con el consorcio LD-76.\***

DIAS	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
0	$9.3 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	$7.2 \times 10^4$	ND	$6.7 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$3.1 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$
15	$2.8 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	ND	$2.3 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$3.4 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$
30	$1.73 \times 10^6$	$1.8 \times 10^5$	$1.01 \times 10^6$	ND	$7.1 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$	$1.29 \times 10^6$	$7.0 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$8.5 \times 10^2$
45	$1.20 \times 10^6$	$8.0 \times 10^4$	$7.0 \times 10^5$	ND	$1.42 \times 10^6$	$9.0 \times 10^4$	$4.00 \times 10^6$	ND	$3.1 \times 10^3$	$8.2 \times 10^2$

\* Los datos son el promedio de tres replicas.

**Tabla 18.-** Número de microorganismos recuperados del medio de cultivo en el experimento de laboratorio con *Serratia marscesens*.\*

DIAS	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
0	1.1X10 <sup>6</sup>	14X10 <sup>6</sup>	1.2X10 <sup>6</sup>	ND	5.3X10 <sup>6</sup>	9.1X10 <sup>6</sup>	9.7X10 <sup>6</sup>	8.5X10 <sup>6</sup>	1.1X10 <sup>6</sup>	9.7X10 <sup>6</sup>
15	2.0X10 <sup>6</sup>	5.0X10 <sup>6</sup>	4.0X10 <sup>6</sup>	ND	3.0X10 <sup>7</sup>	2.3X10 <sup>7</sup>	ND	1.99X10 <sup>5</sup>	3.0X10 <sup>6</sup>	ND
30	1.1X10 <sup>6</sup>	5.9X10 <sup>6</sup>	5.2X10 <sup>6</sup>	ND	6.9X10 <sup>7</sup>	2.1X10 <sup>6</sup>	5.8X10 <sup>6</sup>	1.7X10 <sup>5</sup>	9.5X10 <sup>6</sup>	9.1X10 <sup>5</sup>
45	5.7X10 <sup>6</sup>	5.0X10 <sup>5</sup>	5.7X10 <sup>6</sup>	ND	3.9X10 <sup>7</sup>	1.6X10 <sup>7</sup>	1.7X10 <sup>6</sup>	3.6X10 <sup>7</sup>	2.5X10 <sup>6</sup>	3.7X10 <sup>5</sup>
60	3.3X10 <sup>6</sup>	1.5X10 <sup>6</sup>	7.0X10 <sup>6</sup>	ND	9.0X10 <sup>6</sup>	2.3X10 <sup>7</sup>	4.3X10 <sup>6</sup>	5.5X10 <sup>6</sup>	6.0X10 <sup>5</sup>	9.8X10 <sup>5</sup>
75	ND	4.0X10 <sup>5</sup>	5.6X10 <sup>5</sup>	ND	3.8X10 <sup>5</sup>	ND	ND	ND	1.1X10 <sup>5</sup>	ND

\* Los datos son el promedio de tres replicas.

**Tabla 19.- Número de microorganismos adheridos por cm<sup>2</sup> de muestra de los formulados colocados en Río "La Silla".**

Formulado	Día 10	Día 24	Día 38	Día 48	Día 62
F1	8.15 X 10 <sup>4</sup>	1.815 x 10 <sup>5</sup>	2.8 X 10 <sup>3</sup>	8.0 X 10 <sup>3</sup>	3.0 X 10 <sup>3</sup>
F2	2.0 X 10 <sup>3</sup>	6.95 X 10 <sup>3</sup>	3.1 X 10 <sup>4</sup>	3.0 X 10 <sup>3</sup>	1.65 X 10 <sup>4</sup>
F3	1.265X10 <sup>5</sup>	2.18 X 10 <sup>5</sup>	9.5 X 10 <sup>4</sup>	5.5 X 10 <sup>5</sup>	7.5 X 10 <sup>3</sup>
F4	1.45 X 10 <sup>4</sup>	1.45 X 10 <sup>5</sup>	4.7 X 10 <sup>4</sup>	6.0 x 10 <sup>4</sup>	1.25 X 10 <sup>5</sup>
F5	5.3 X 10 <sup>4</sup>	2.44x 10 <sup>5</sup>	4.2 X 10 <sup>5</sup>	8.8 X 10 <sup>4</sup>	7.0 X 10 <sup>3</sup>
F6	6.1 X 10 <sup>3</sup>	1.69 X 10 <sup>5</sup>	3.6 X 10 <sup>3</sup>	1.5 X 10 <sup>4</sup>	1.8 X 10 <sup>4</sup>
F7	2.4 X 10 <sup>3</sup>	2.5 X 10 <sup>5</sup>	7.3 X 10 <sup>3</sup>	1.9 X 10 <sup>4</sup>	1.8 X 10 <sup>3</sup>
F8	1.9 X 10 <sup>3</sup>	ND	5.4 X 10 <sup>5</sup>	2.7 X 10 <sup>5</sup>	6.0 X 10 <sup>3</sup>
F9	5.2x 10 <sup>3</sup>	3.75 X 10 <sup>2</sup>	3.75 X 10 <sup>4</sup>	ND	3.4 X 10 <sup>4</sup>
F10	1.3 X 10 <sup>3</sup>	1.5 x 10 <sup>3</sup>	4.5 X 10 <sup>4</sup>	2.0 X 10 <sup>4</sup>	8.0 X 10 <sup>3</sup>

\* Los datos representan el promedio de tres replicas.

**Tabla 20.- Número de microorganismos adheridos por cm<sup>2</sup> de muestra de los formulados colocados en suelo de jardín (Enero a Mayo'94).\***

Formulado	Día 15	Día 30	Día 45	Día 58	Día 78	Día 90	Día 105	Día 120
F1	ND	ND	29 X 10 <sup>5</sup>	31 X 10 <sup>4</sup>	32 X 10 <sup>3</sup>	42 X 10 <sup>4</sup>	14 X 10 <sup>5</sup>	19 X 10 <sup>4</sup>
F2	37 X 10 <sup>4</sup>	ND	14 X 10 <sup>6</sup>	33 X 10 <sup>3</sup>	55 X 10 <sup>4</sup>	45 X 10 <sup>4</sup>	67 X 10 <sup>3</sup>	ND
F3	54 X 10 <sup>4</sup>	ND	58 X 10 <sup>6</sup>	95 X 10 <sup>5</sup>	3.0 X 10 <sup>4</sup>	17 X 10 <sup>5</sup>	10 X 10 <sup>4</sup>	19 X 10 <sup>4</sup>
F4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F5	ND	ND	7.0 X 10 <sup>6</sup>	56 x 10 <sup>3</sup>	14 X 10 <sup>4</sup>	33 X 10 <sup>4</sup>	69 X 10 <sup>3</sup>	68 X 10 <sup>3</sup>
F6	ND	ND	27 X 10 <sup>6</sup>	28 x 10 <sup>6</sup>	1.0 X 10 <sup>5</sup>	27 X 10 <sup>4</sup>	8.0 X 10 <sup>4</sup>	15 X 10 <sup>4</sup>
F7	15 X 10 <sup>5</sup>	64 X 10 <sup>7</sup>	16 x 10 <sup>5</sup>	15 X 10 <sup>5</sup>	3 X 10 <sup>6</sup>	44 X 10 <sup>4</sup>	65 X 10 <sup>4</sup>	58 X 10 <sup>5</sup>
F8	97 X 10 <sup>4</sup>	ND	4.0 X 10 <sup>6</sup>	8.0 X 10 <sup>4</sup>	14 X 10 <sup>3</sup>	35 X 10 <sup>3</sup>	5.0 X 10 <sup>4</sup>	10 X 10 <sup>3</sup>
F9	14 X 10 <sup>4</sup>	ND	12 X 10 <sup>6</sup>	14 X 10 <sup>5</sup>	7.0 X 10 <sup>3</sup>	39 X 10 <sup>2</sup>	69 X 10 <sup>2</sup>	56 X 10 <sup>3</sup>
F10	14 X 10 <sup>5</sup>	ND	4.0 X 10 <sup>5</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup>	77 X 10 <sup>3</sup>	7.0 X 10 <sup>3</sup>	31 X 10 <sup>2</sup>	ND

\* Los datos representan el promedio de tres replicas.

**Tabla 21.- Número de microorganismos adheridos por cm<sup>2</sup> de muestra de los formulados colocados en suelo de jardín (Octubre'94 a Enero'95).\***

Formulado	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	DÍA 75	Día 90	Día 105	Día 120
F1	2.3 X 10 <sup>4</sup>	66 X 10 <sup>3</sup>	83 X 10 <sup>4</sup>	35 X 10 <sup>4</sup>	ND	14 X 10 <sup>4</sup>	ND	ND
F2	4.1 X 10 <sup>4</sup>	80 X 10 <sup>4</sup>	30 X 10 <sup>4</sup>	20 X 10 <sup>4</sup>	ND	26 X 10 <sup>4</sup>	ND	ND
F3	32 X 10 <sup>4</sup>	9 X 10 <sup>5</sup>	6.7 X 10 <sup>4</sup>	12.9 X 10 <sup>5</sup>	ND	1.9 X 10 <sup>5</sup>	ND	ND
F4	5.1 X 10 <sup>4</sup>	9.6 X 10 <sup>4</sup>	5.6 X 10 <sup>5</sup>	1.5 X 10 <sup>5</sup>	ND	1.9 X 10 <sup>4</sup>	ND	ND
F5	3 X 10 <sup>4</sup>	9.4 X 10 <sup>4</sup>	3.3 X 10 <sup>6</sup>	1.8 X 10 <sup>5</sup>	ND	10 X 10 <sup>4</sup>	ND	ND
F6	ND	1.8 X 10 <sup>4</sup>	2.8 X 10 <sup>4</sup>	5 X 10 <sup>4</sup>	ND	7 X 10 <sup>4</sup>	ND	ND
F7	ND	10 X 10 <sup>7</sup>	5.6 X 10 <sup>6</sup>	1.6 X 10 <sup>6</sup>	ND	1 X 10 <sup>5</sup>	ND	ND
F8	ND	1 X 10 <sup>5</sup>	3 X 10 <sup>6</sup>	3.2 X 10 <sup>5</sup>	ND	4.1 X 10 <sup>5</sup>	ND	ND
F9	ND	5 X 10 <sup>3</sup>	2.8 X 10 <sup>5</sup>	3.9 X 10 <sup>4</sup>	ND	1.9 X 10 <sup>4</sup>	ND	ND
F10	ND	8 X 10 <sup>4</sup>	5.2 X 10 <sup>5</sup>	4.8 X 10 <sup>4</sup>	ND	2.7 X 10 <sup>4</sup>	ND	ND

\* Los datos representan el promedio de tres replicas.

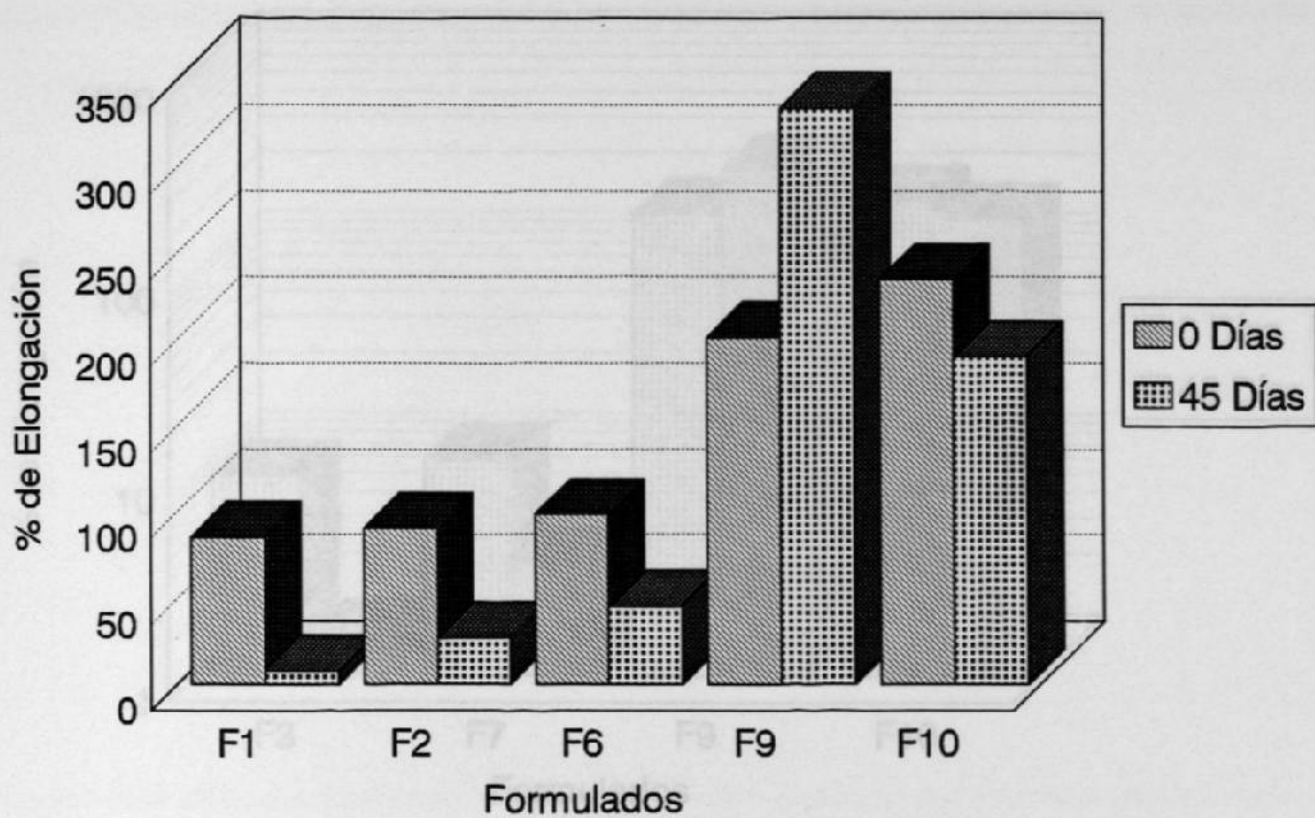


Fig.15 Porcentaje de Elongación de Formulados del Grupo 1(Almidón), después de 45 días de exposición al consorcio bacteriano LD-76.

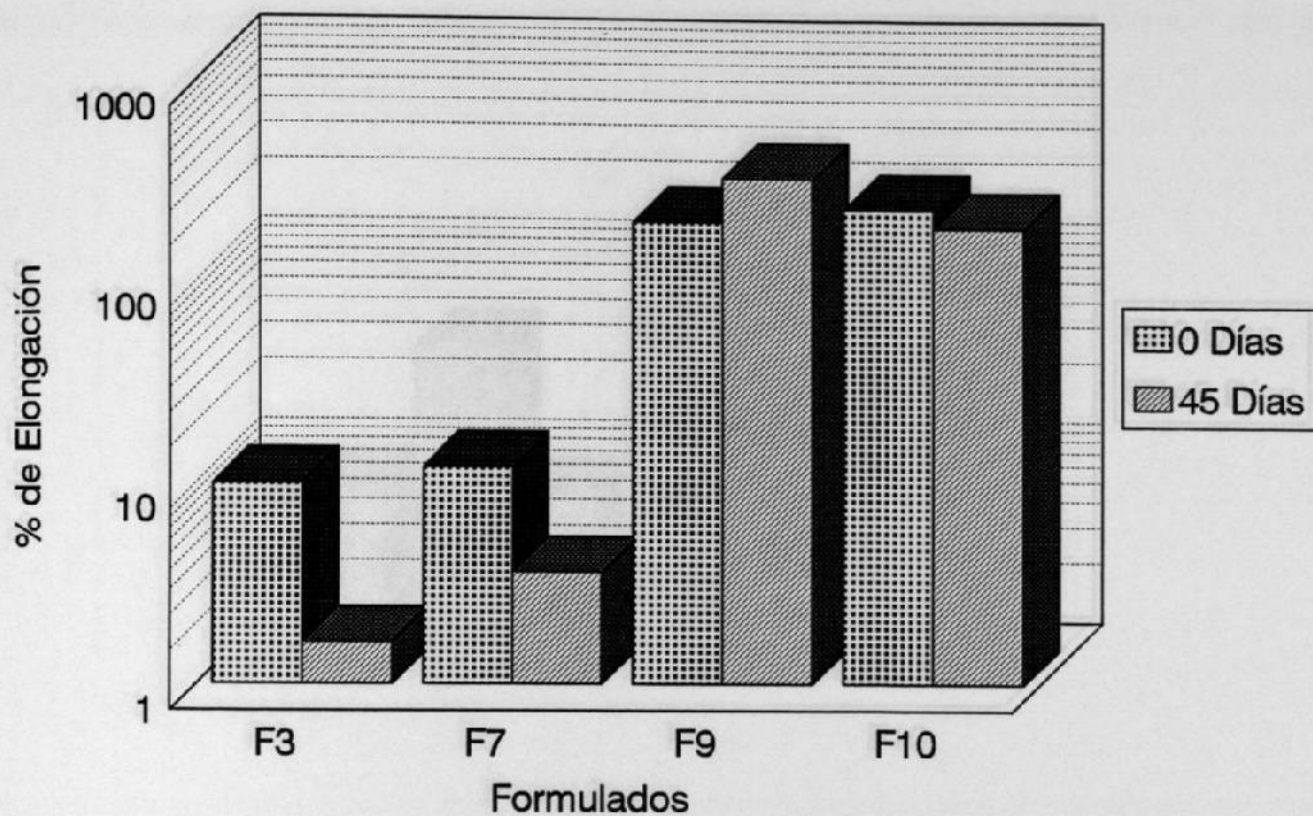


Fig.16 Porcentaje de Elongación de Formulados del Grupo 2 (Quitina), después de 45 días de exposición al consorcio bacteriano LD-76.



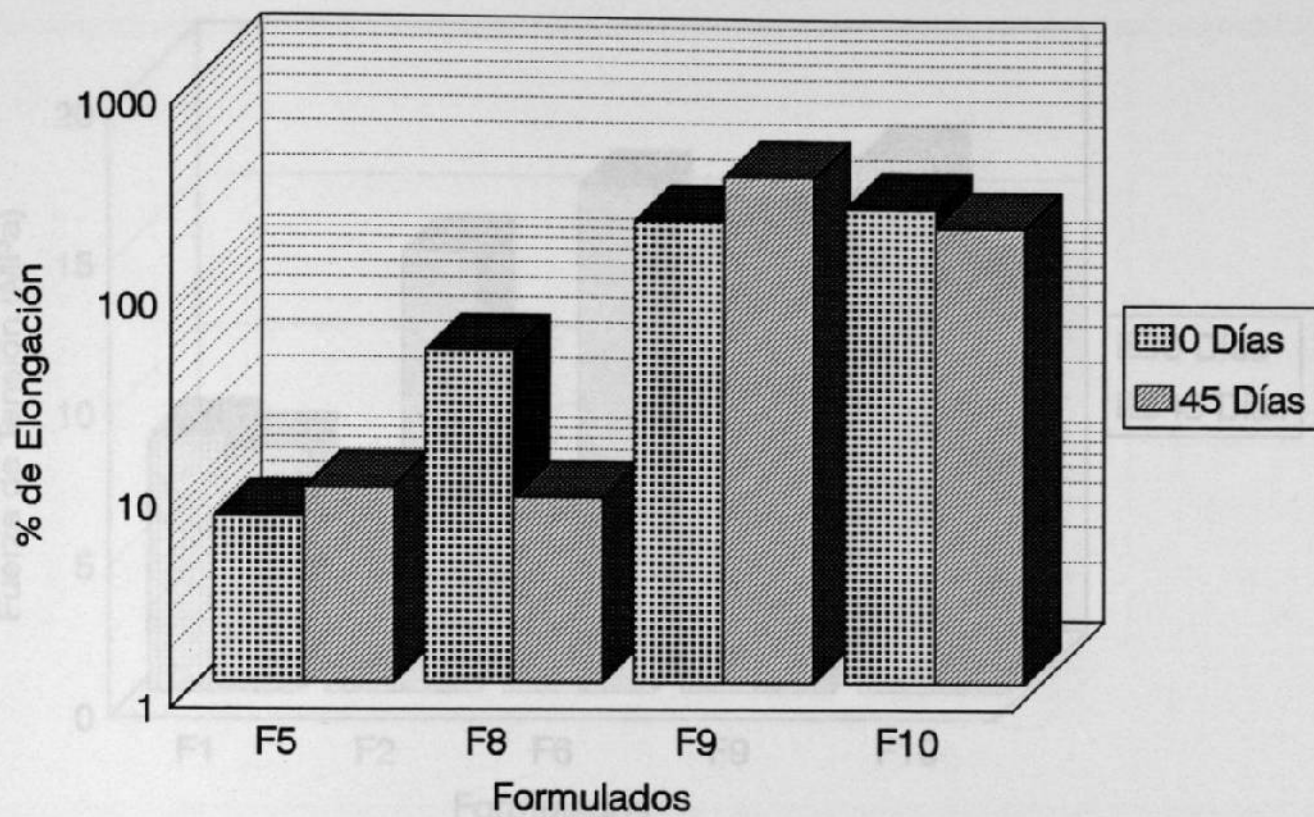


Fig.17 Porcentaje de Elongación de Formulados del Grupo 4 (Pectina), después de 45 días de exposición al consorcio bacteriano LD-76.

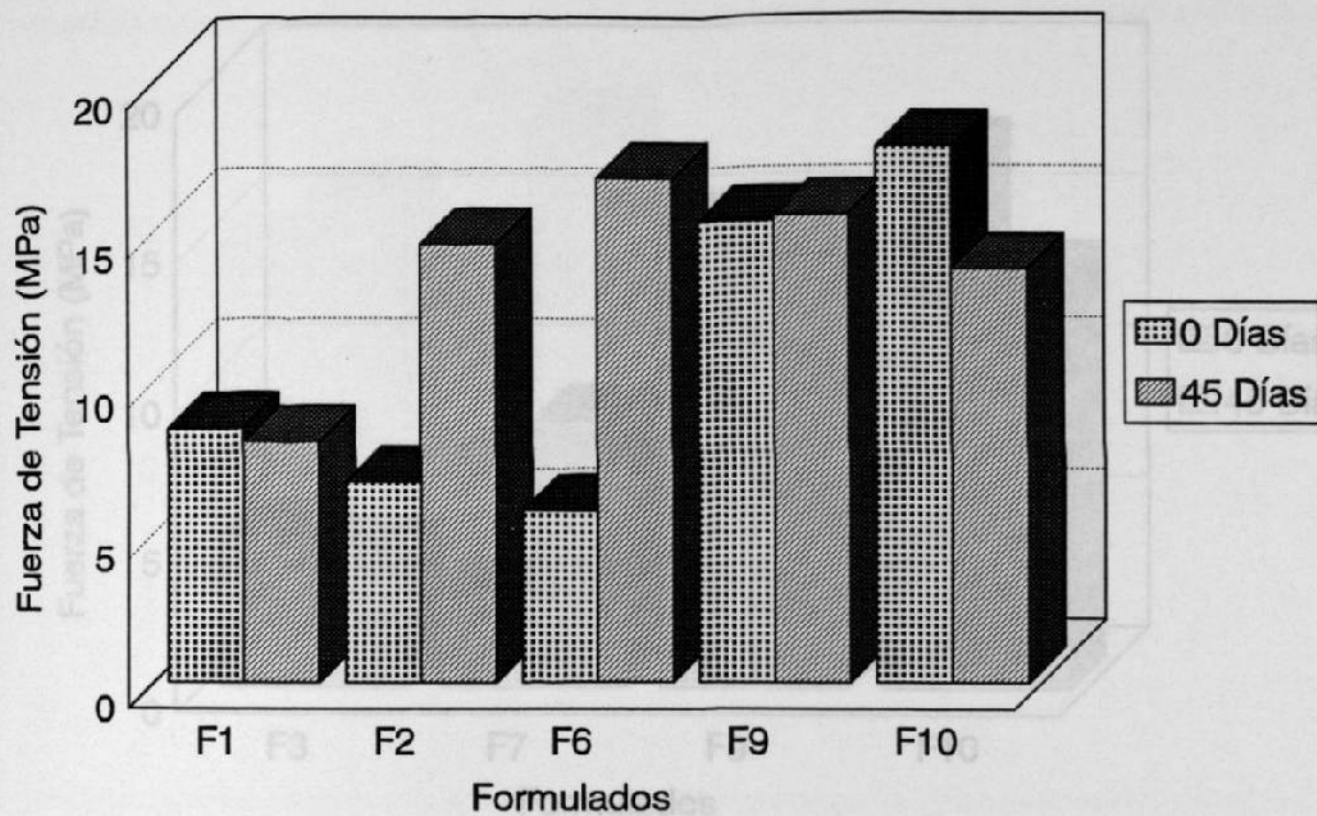


Fig.18 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 1 (Almidón), después de 45 días de exposición al consorcio bacteriano LD-76.

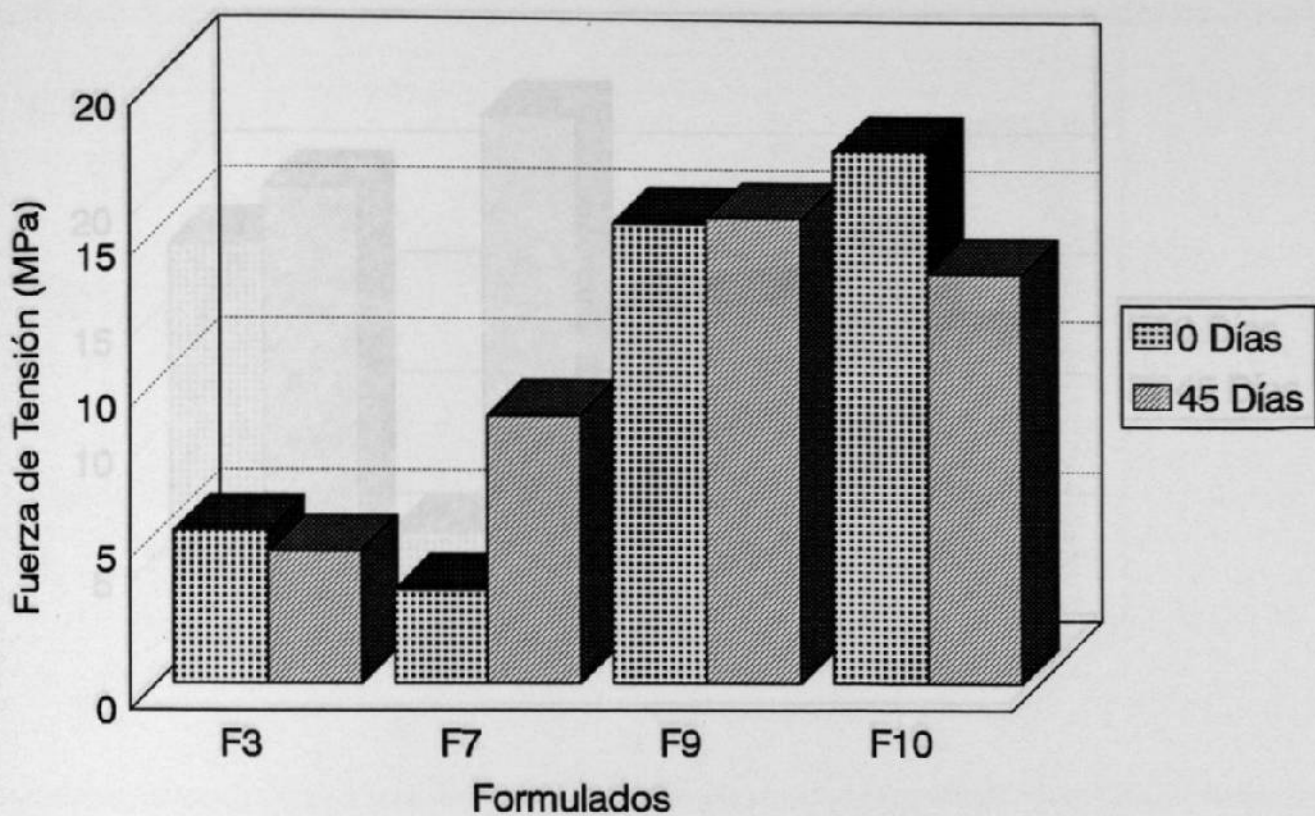


Fig.19 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 2 (Quitina), después de 45 días de exposición al consorcio bacteriano LD-76.

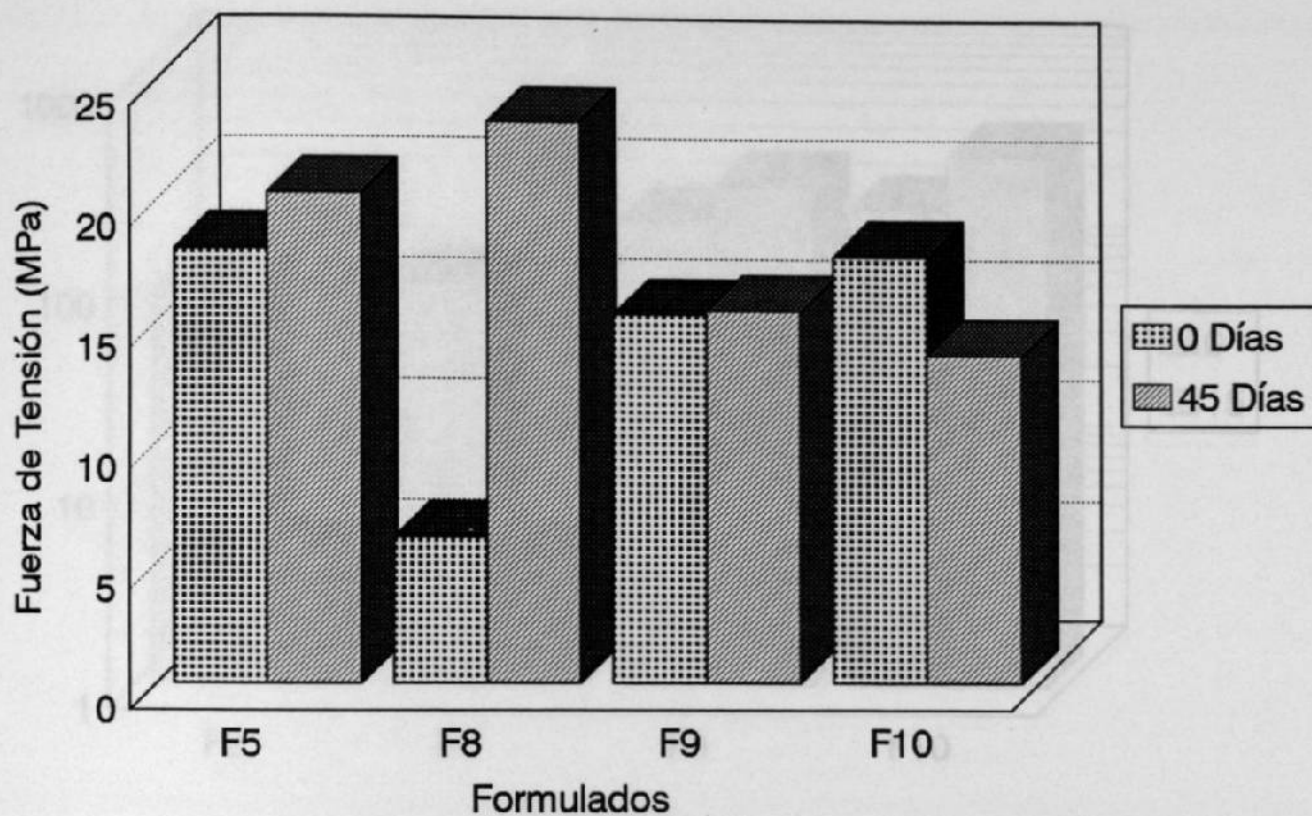


Fig.20 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 4 (Pectina), después de 45 días de exposición al consorcio bacteriano LD-76.

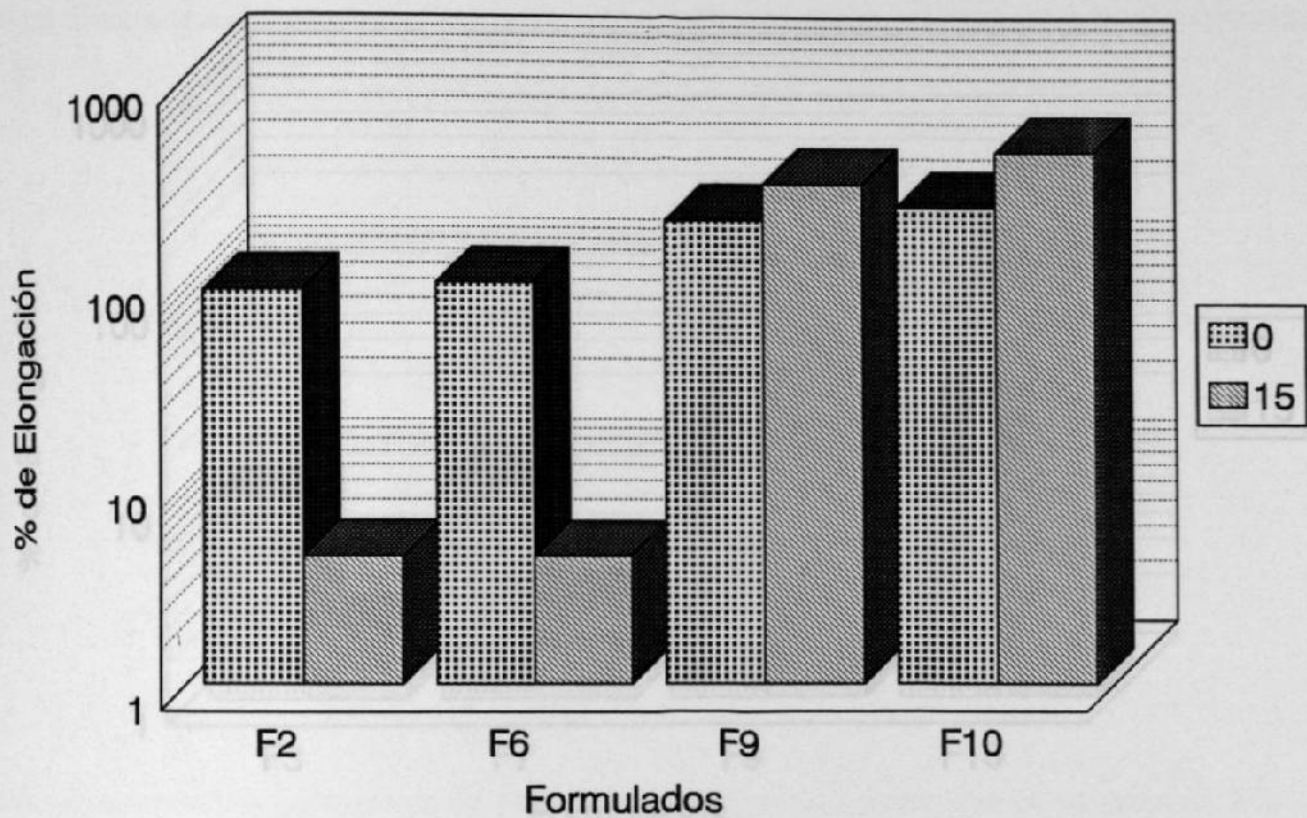


Fig. 21 Porcentaje de Elongación de Formulados del Grupo 1 (Almidón), después de 15 días de exposición en suelo. Enero-Mayo'94.

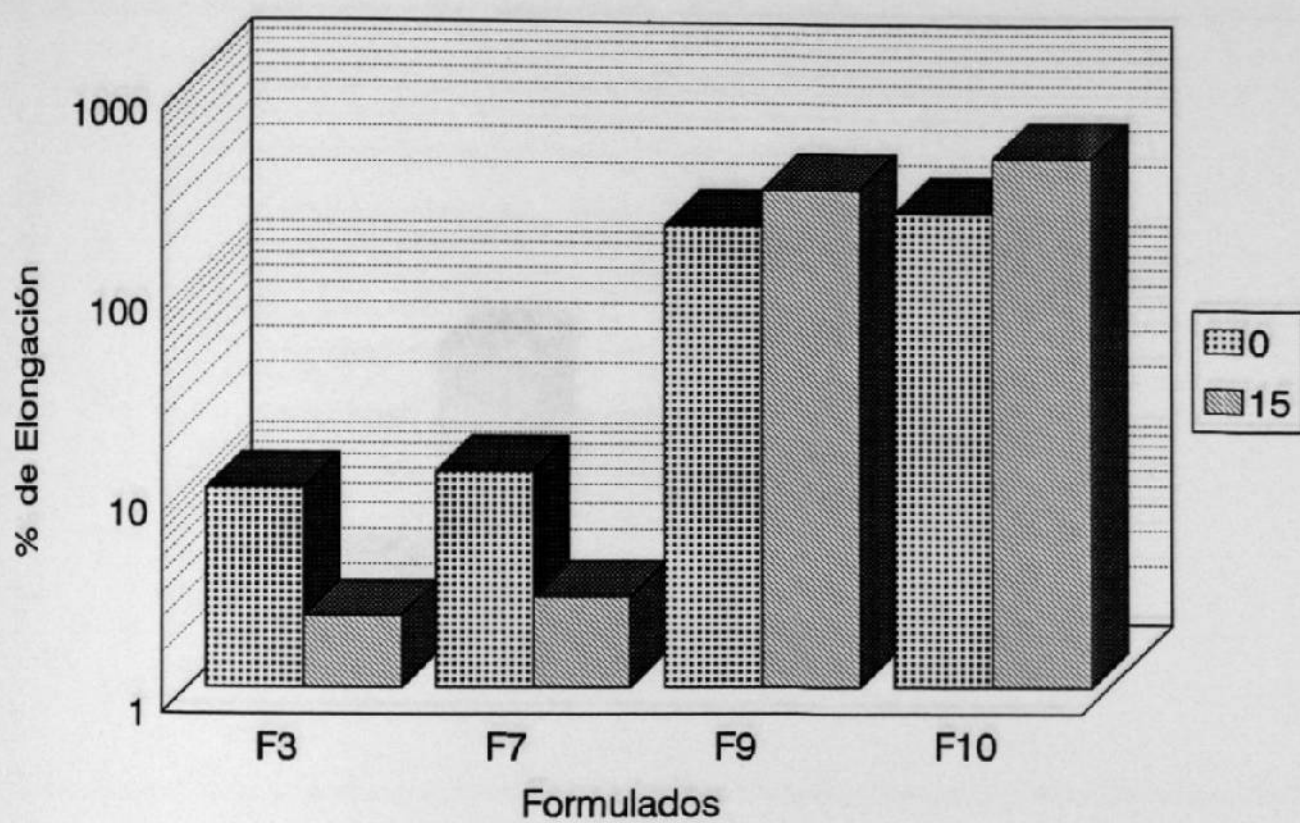


Fig. 22 Porcentaje de Elongación de Formulados del Grupo 2 (quitina), después de 15 días de exposición en suelo. Enero-Mayo'94.