

Fig. 23 Porcentaje de Elongación de Formulados del Grupo 4 (Pectina), después de 15 días de exposición en suelo. Enero-Mayo'94.

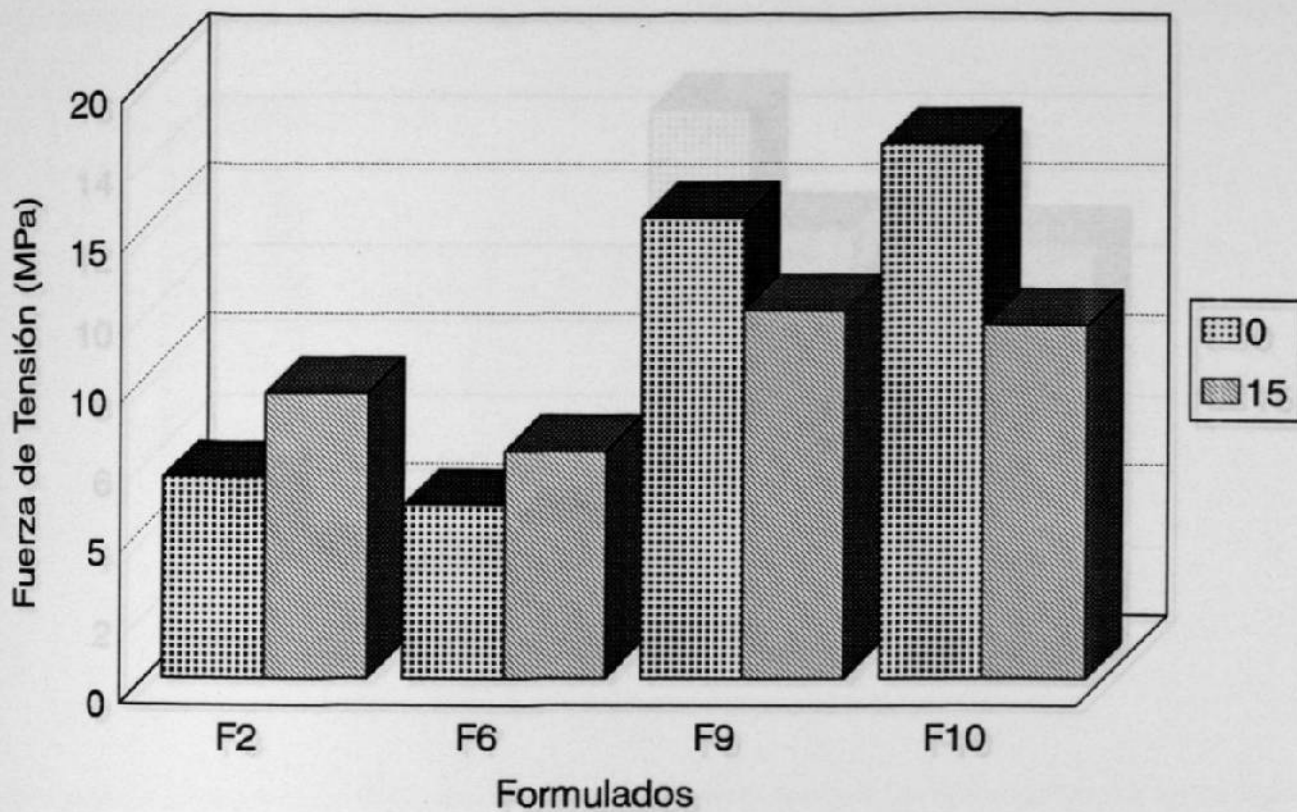


Fig. 24 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 1 (Almidón), después de 15 días de exposición en suelo. Enero-Mayo'94.

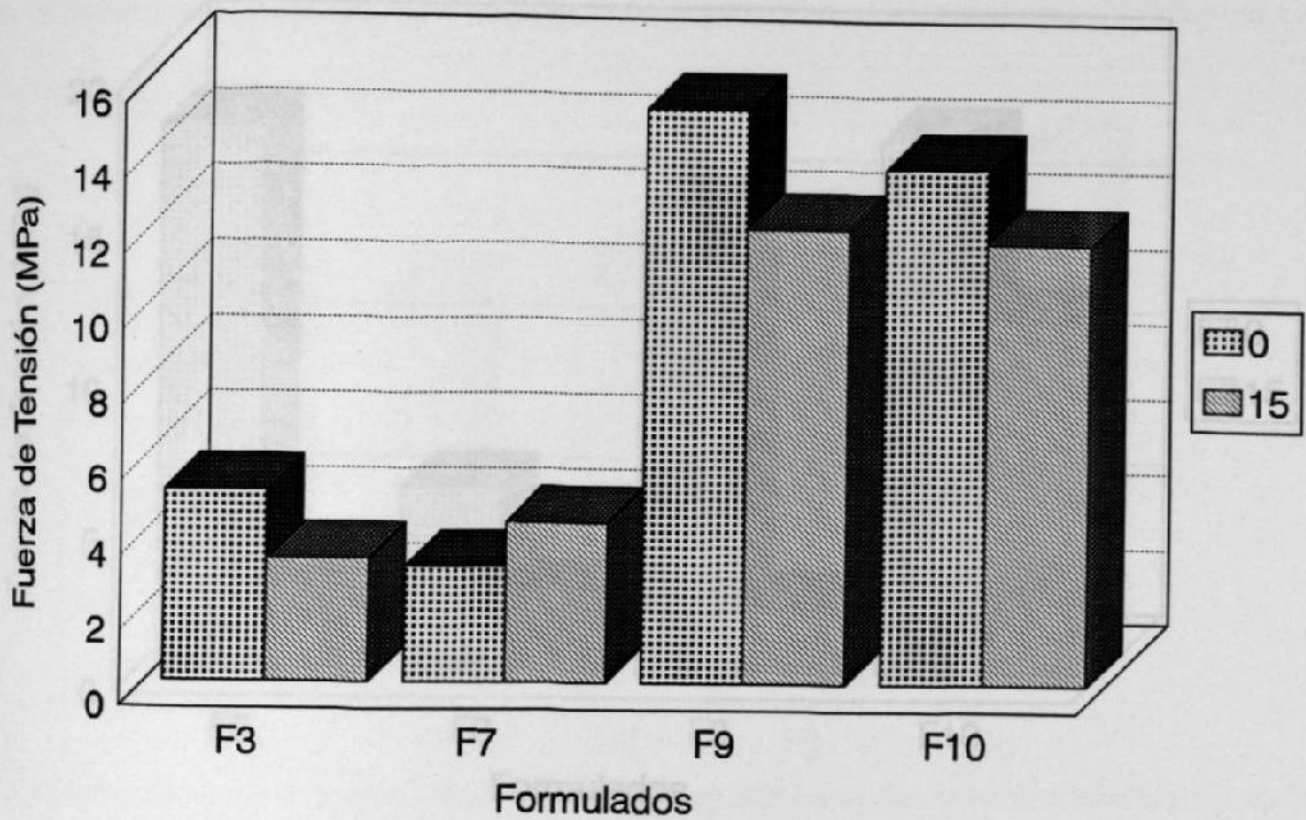


Fig. 25 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 2 (Quitina), después de 15 días de exposición en suelo. Enero-Mayo'94.

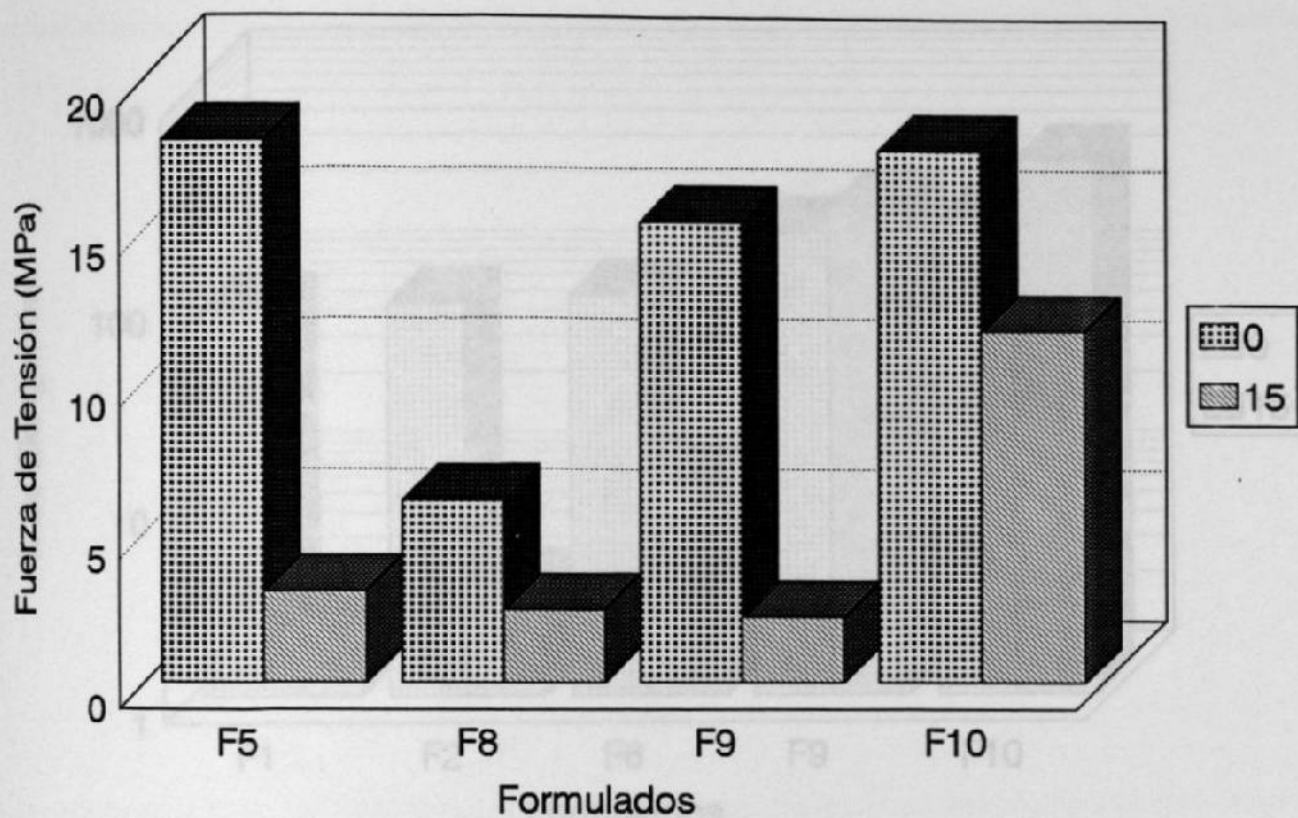


Fig. 26 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 4 (Pectina), después de 15 días de exposición en suelo. Enero-Mayo'94.

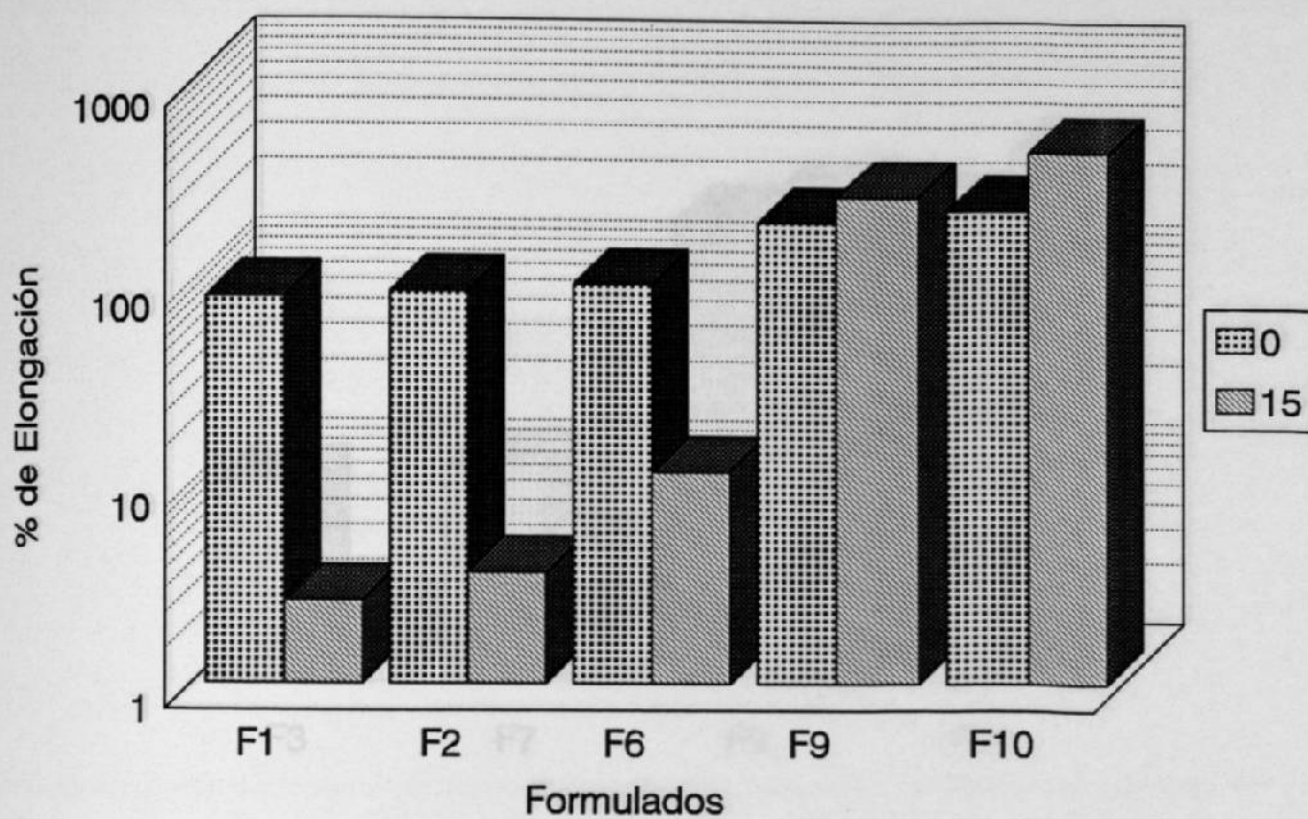


Fig. 27 Porcentaje de Elongación en Formulados del Grupo 1 (Almidón), después de 15 días de exposición en suelo. Octubre'94-Enero'95.

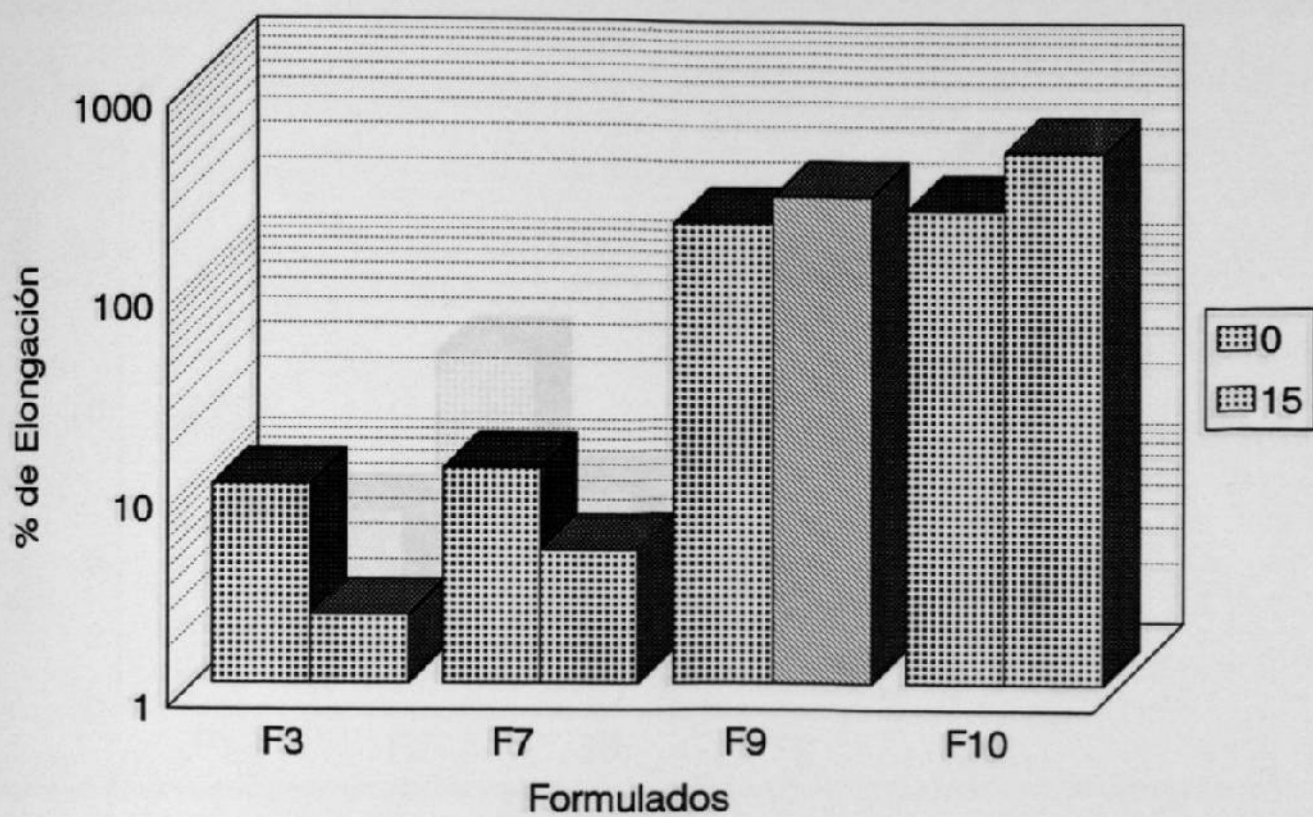


Fig. 28 Porcentaje de Elongación de los Formulados del Grupo 2 (Quitina), después de 15 días de exposición en suelo. Octubre'94-Enero'95.

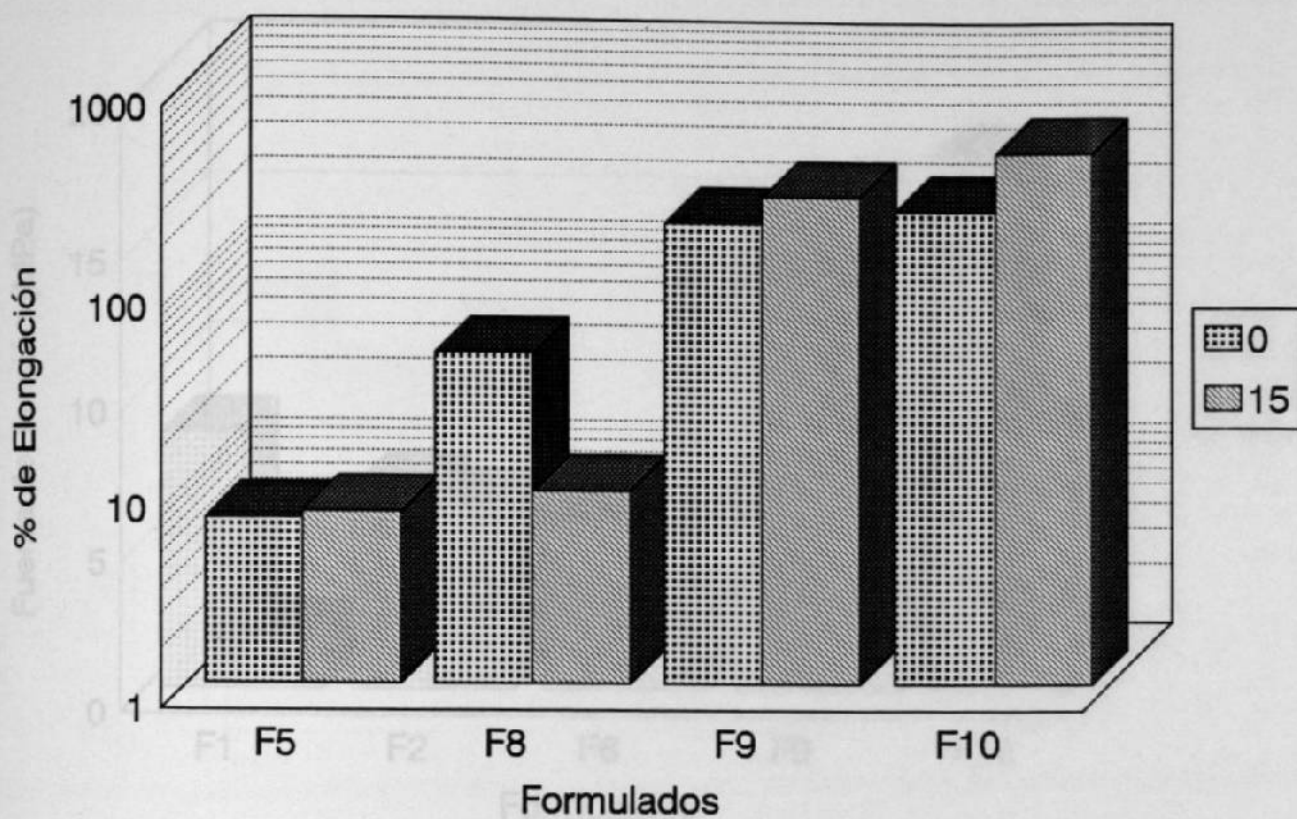


Fig. 29 Porcentaje de Elongación en Formulados del Grupo 4 (pectina), después de 15 días de exposición en suelo. Octubre'94-Enero'95.

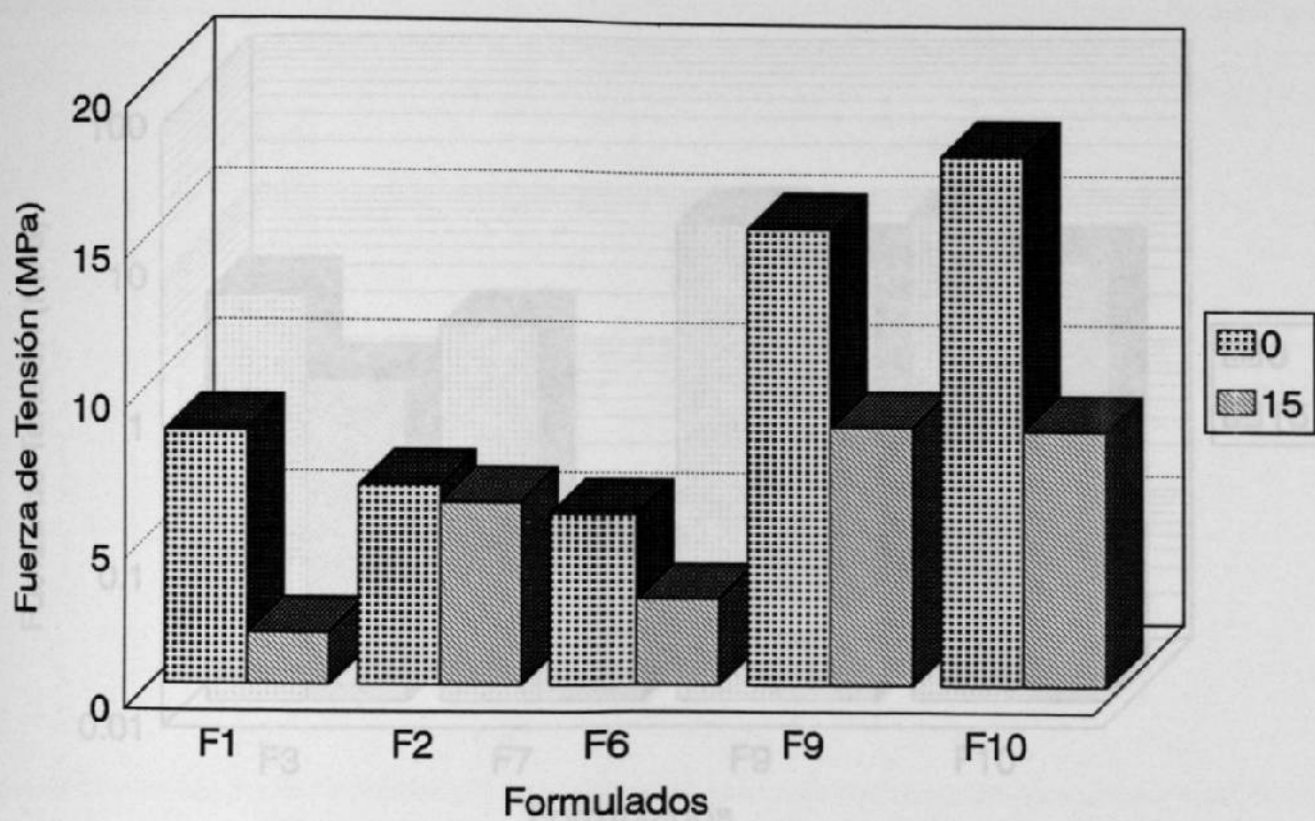


Fig. 30 Fuerza de Tensión de los Formulados del Grupo 1(Almidón), después de 15 días de exposición en suelo. Octubre'94-Enero'95.

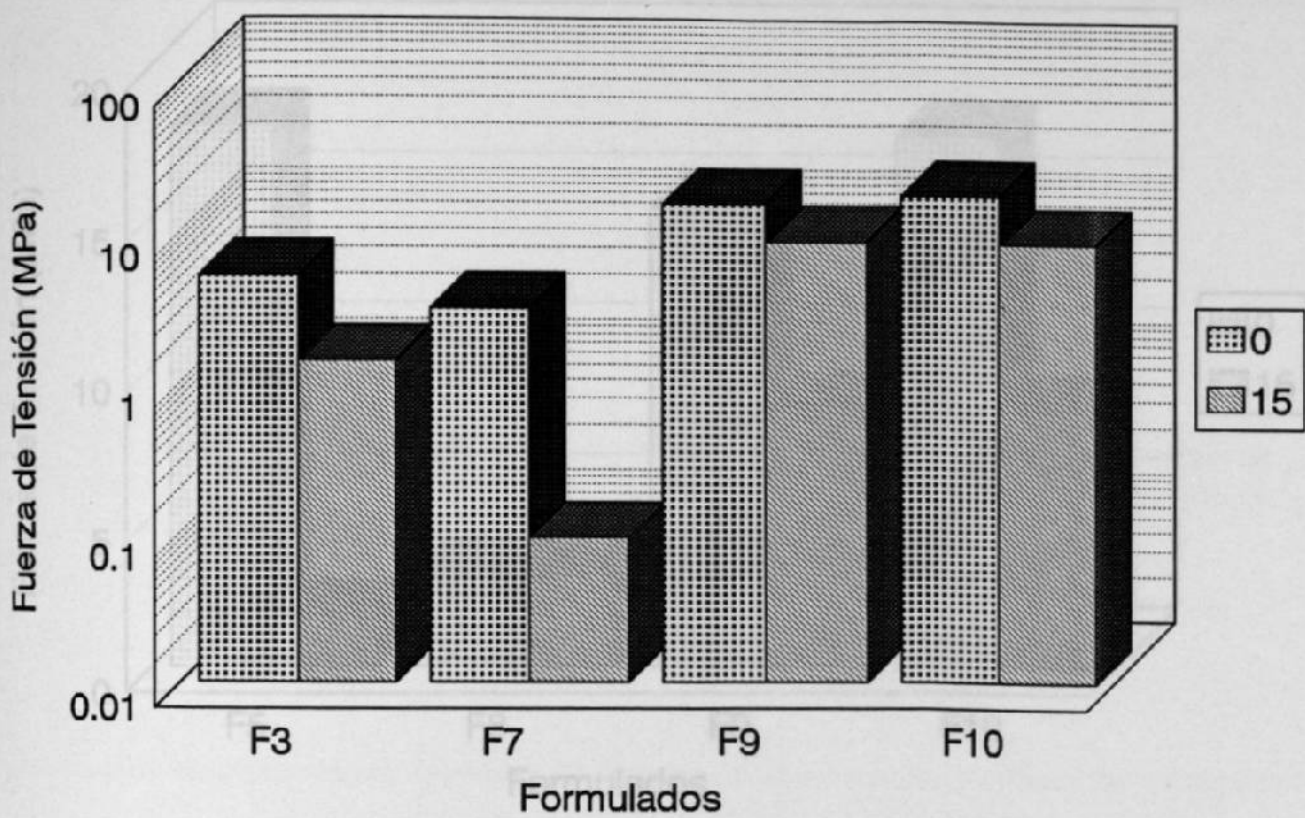


Fig. 31 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 2 (Quitina), después de 15 días en exposición al suelo. Octubre'94-Enero'95.

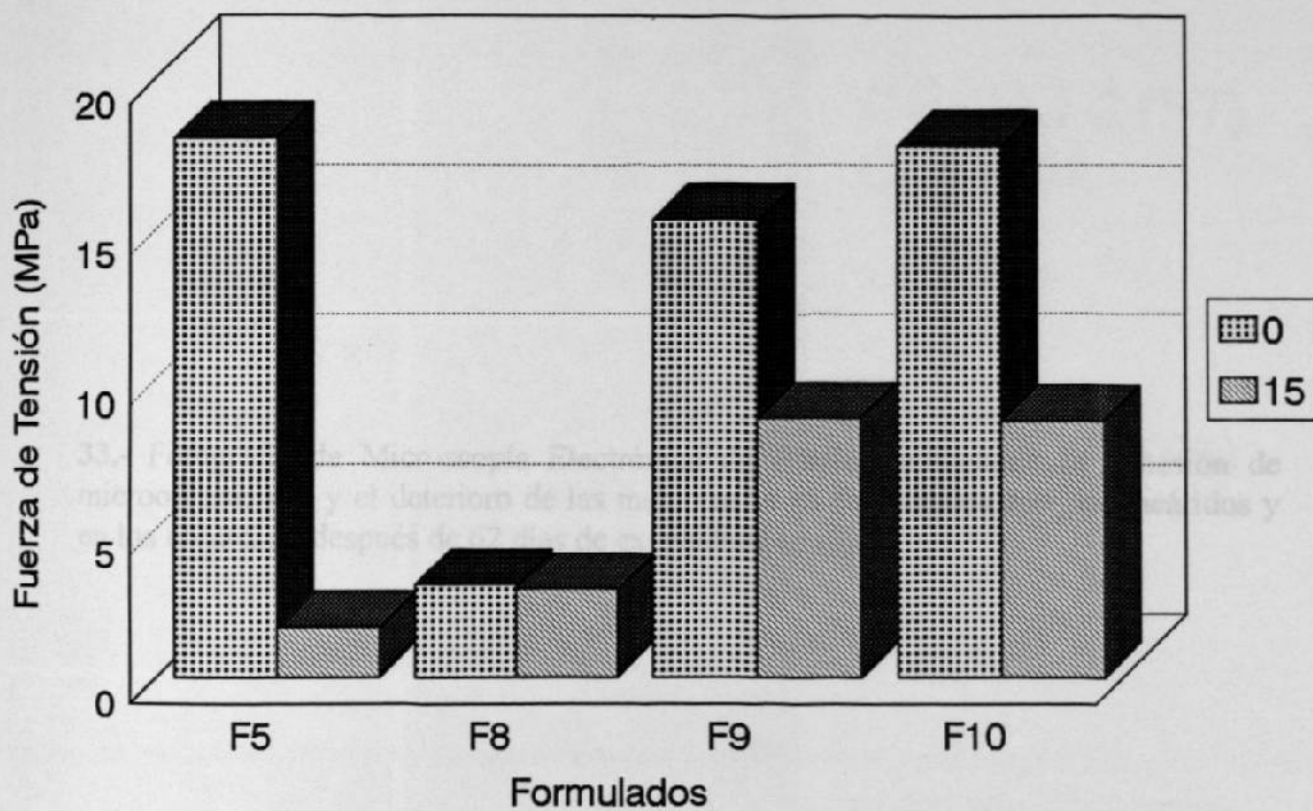
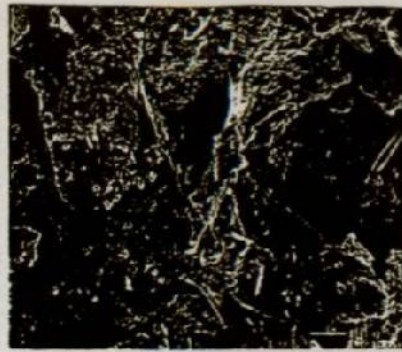
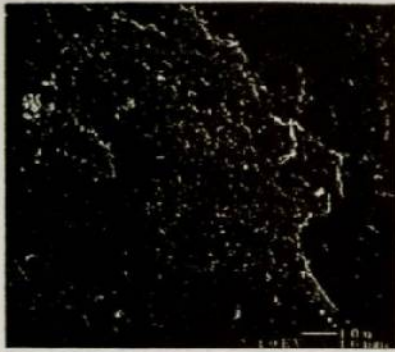


Fig. 32 Fuerza de Tensión de Formulados del Grupo 4 (Pectina), después de 15 días de exposición en suelo. Octubre'94-Enero'95.

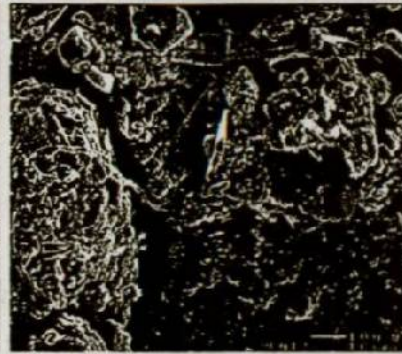
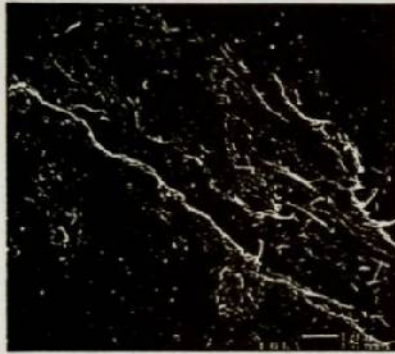
33.- Fotografía de Microscopía Electrónica de Barrido mostrando la adhesión de microorganismos y el deterioro de las membranas en formulados con polisacáridos y en los controles, después de 62 días de exposición en río.

0 DIAS

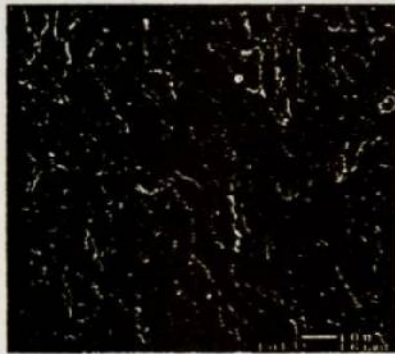
62 DIAS



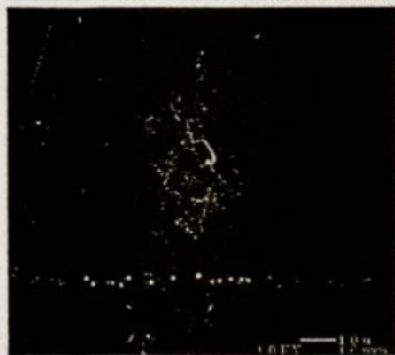
**GRUPO 1 (F1)
ALMIDON**



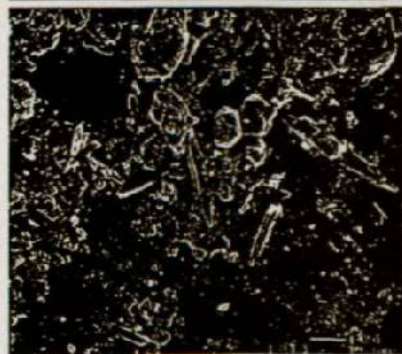
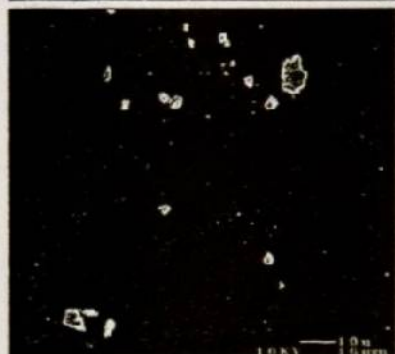
**GRUPO 2 (F7)
QUITINA**



**GRUPO 4 (F5)
PECTINA**



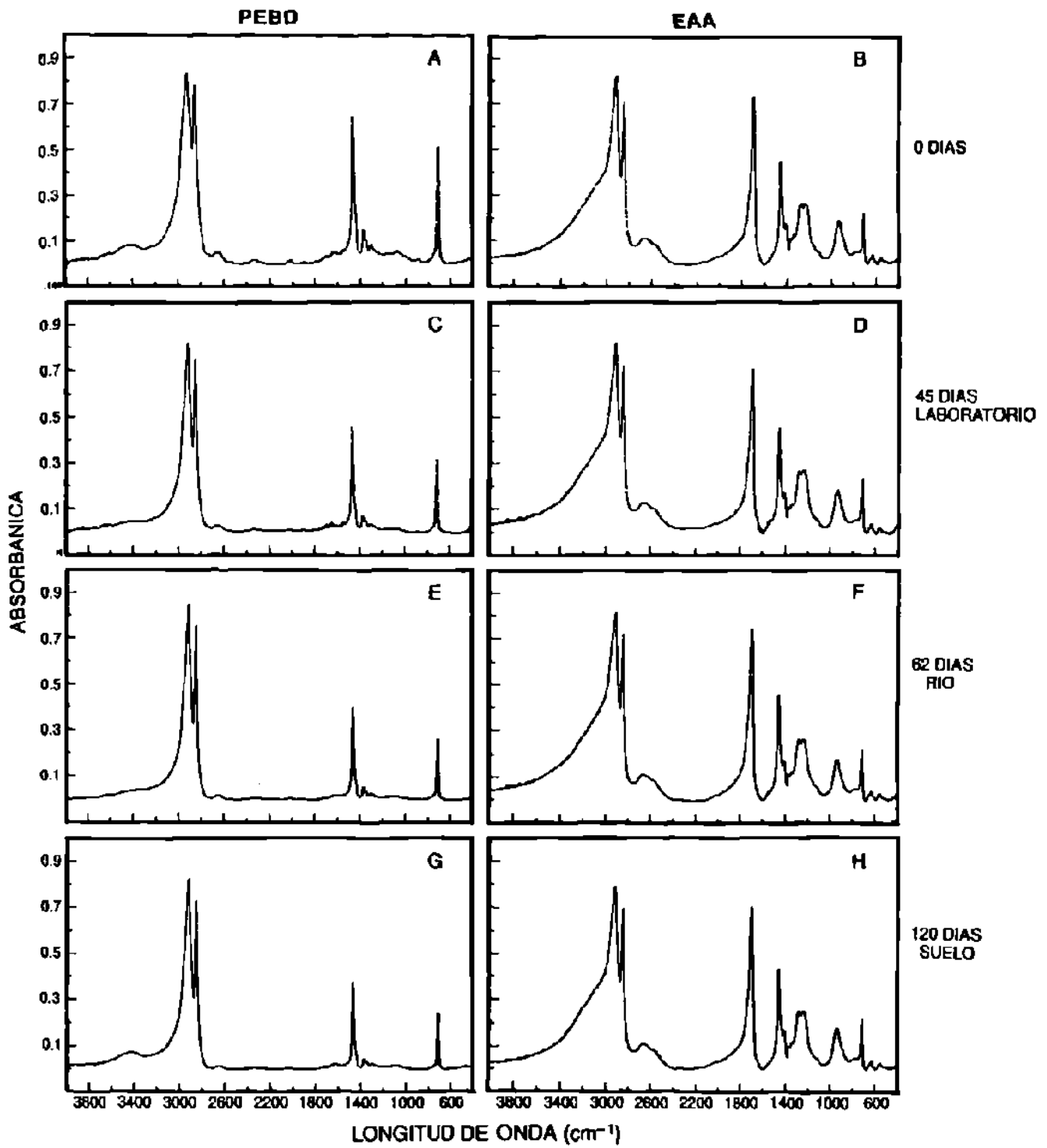
**GRUPO 5 (F9)
PEBD**



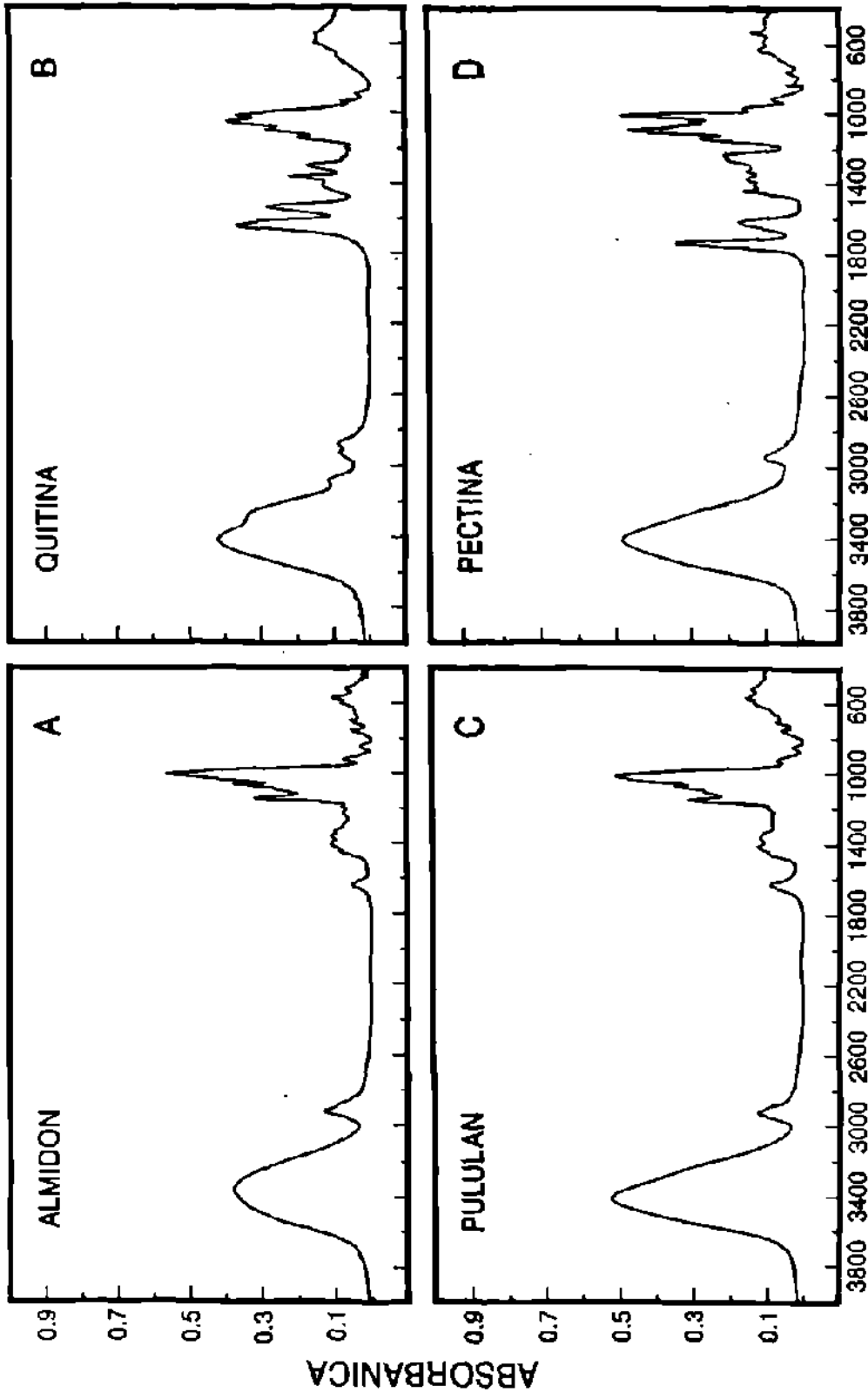
**GRUPO 5 (F10)
EAA**

10μ

34.- Espectros de IRTF de los controles F9 (PEBD) y F10 (EAA) a los 0 días (A,B) y después de exponerse por 45 días al consorcio bacteriano LD-76 (C,D); después 62 días en río (E,F) y 120 días en suelo (G,H).

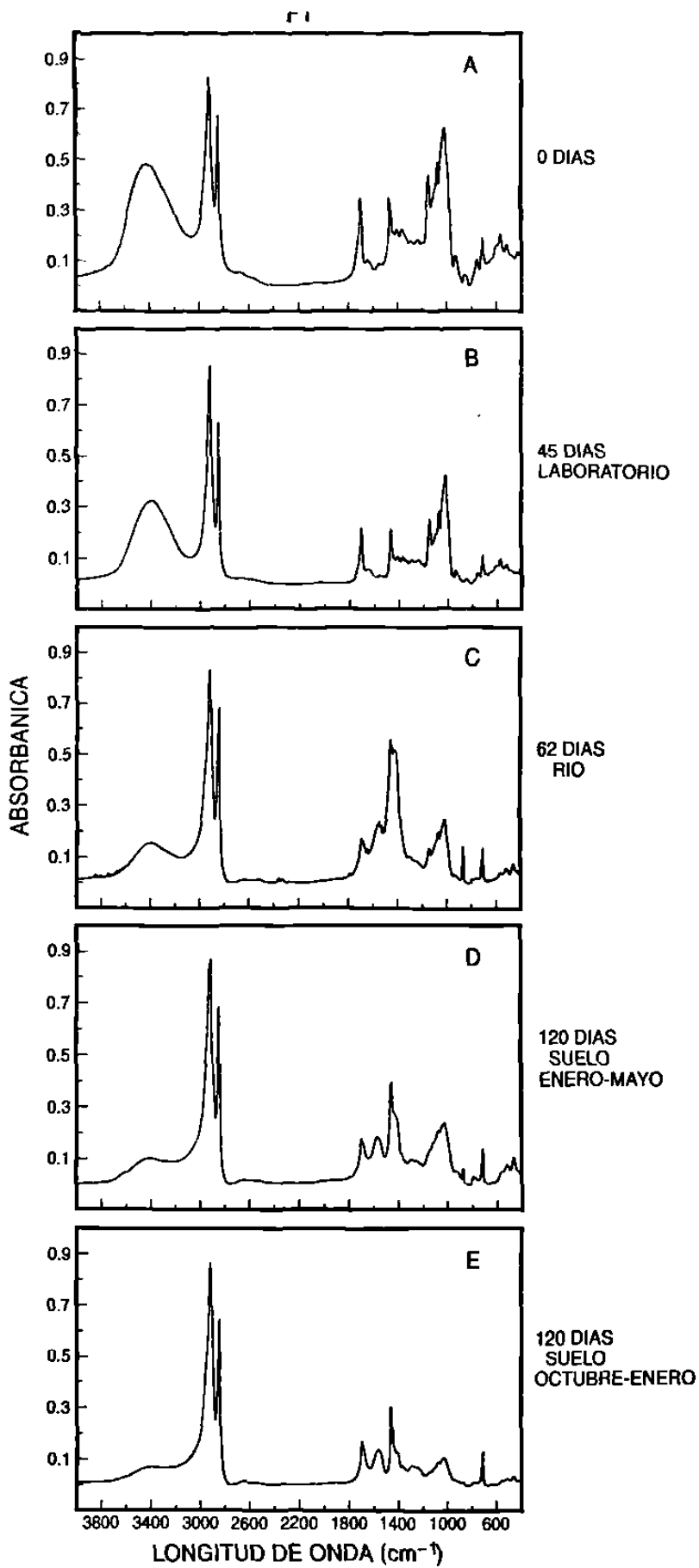


35.- Espectros de IRTF de los polisacáridos utilizados en la elaboración de las diferentes membranas: A (almidón); B (quitina); C (pululan) y D (pectina).

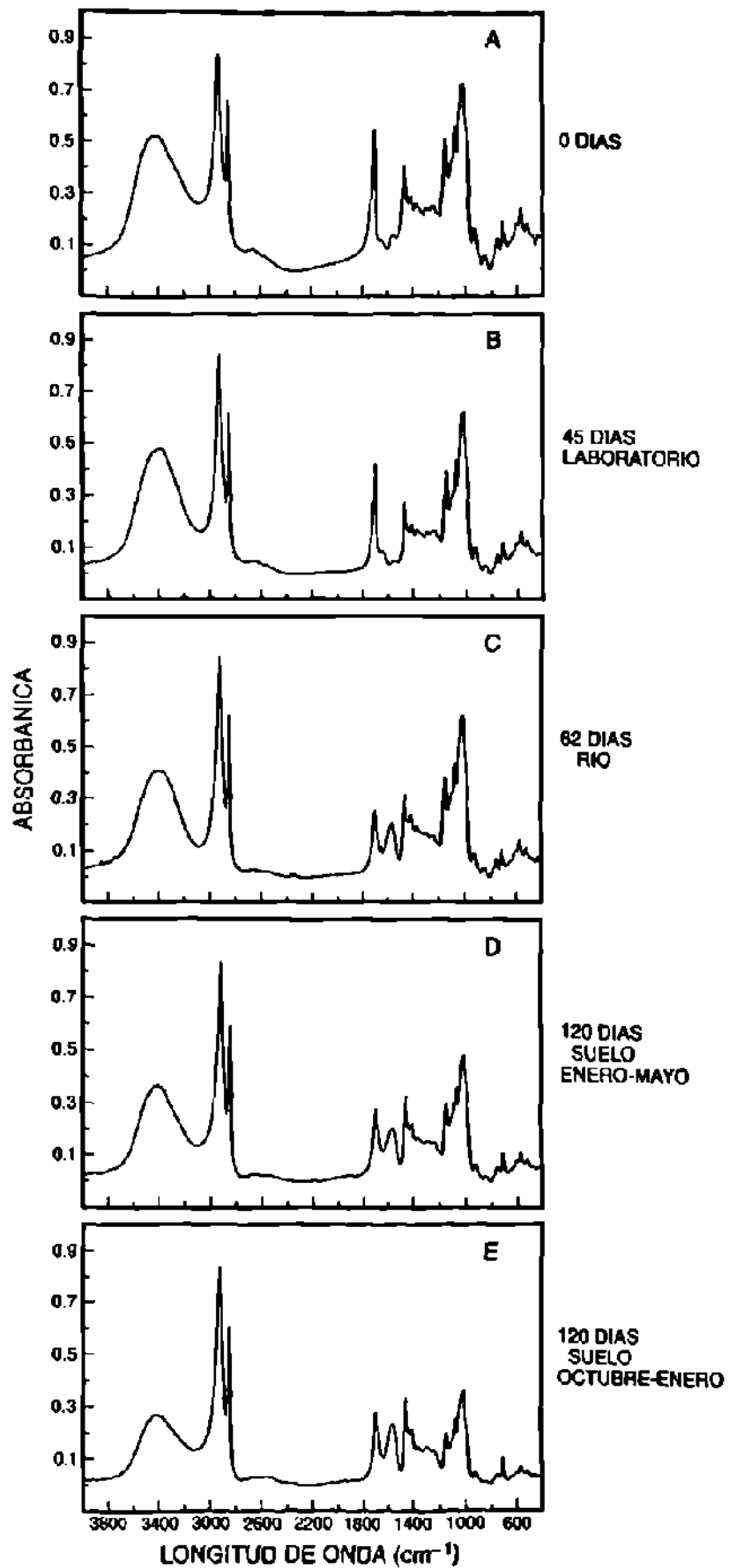


LONGITUD DE ONDA (cm⁻¹)

36.- Espectros de IRTF del formulado F1 (grupo de almidón), antes y después de ser expuesto a los diferentes ecosistemas de estudio.

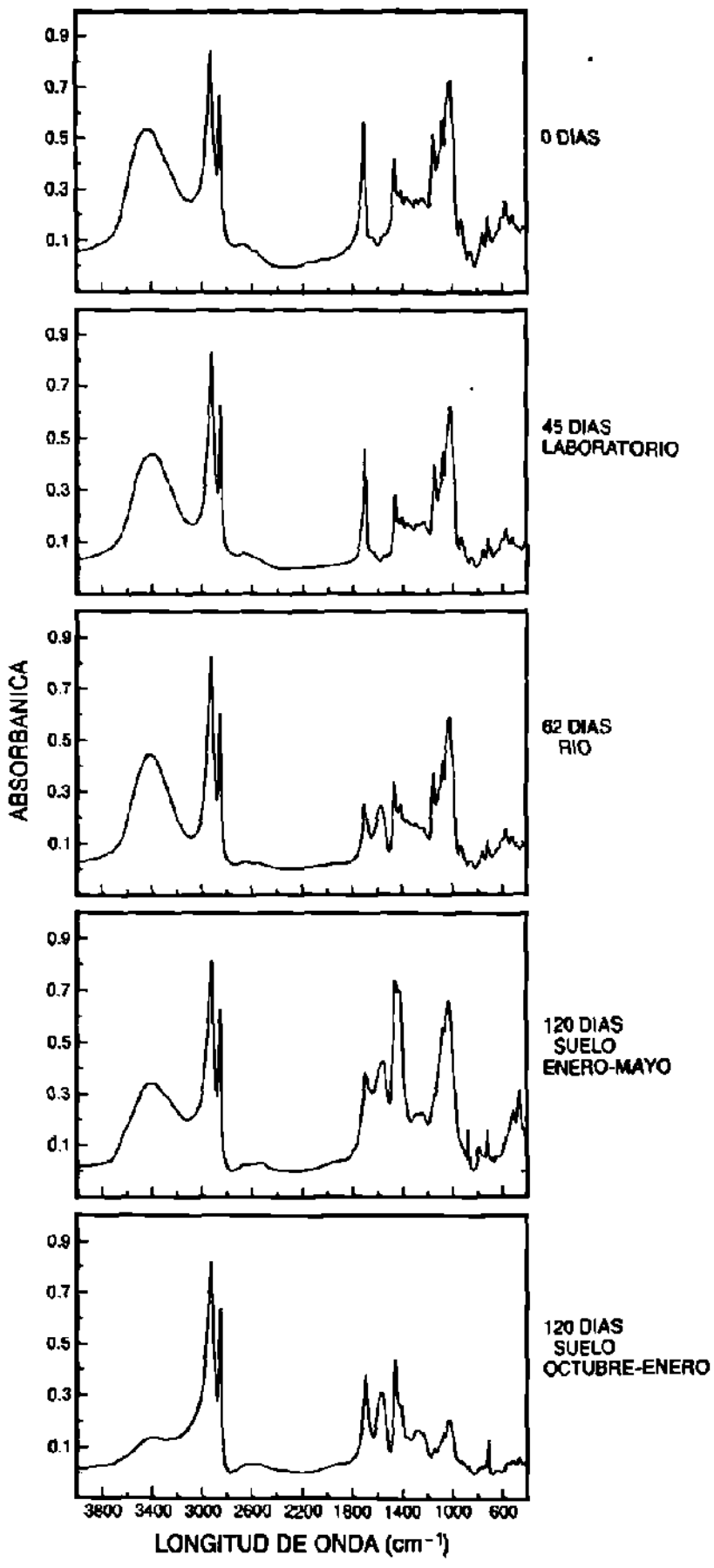


37.- Espectros de IRTF del formulado F2 (grupo de almidón), antes y después de ser expuesto a los diferentes ecosistemas de estudio.

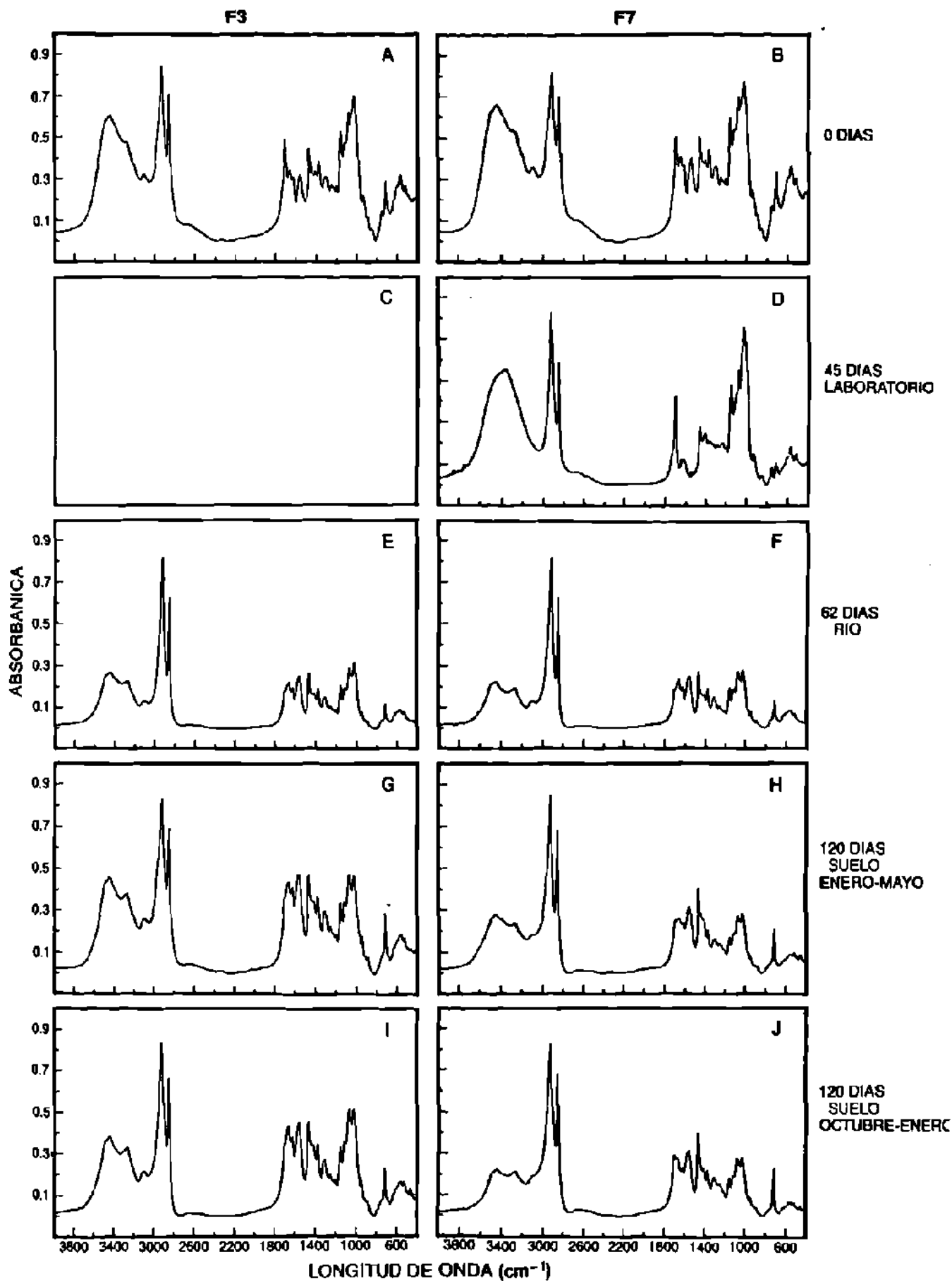


38.- Espectros de IRTF del formulado F6 (grupo de almidón), antes y después de ser expuesto a los diferentes ecosistemas de estudio.

F6

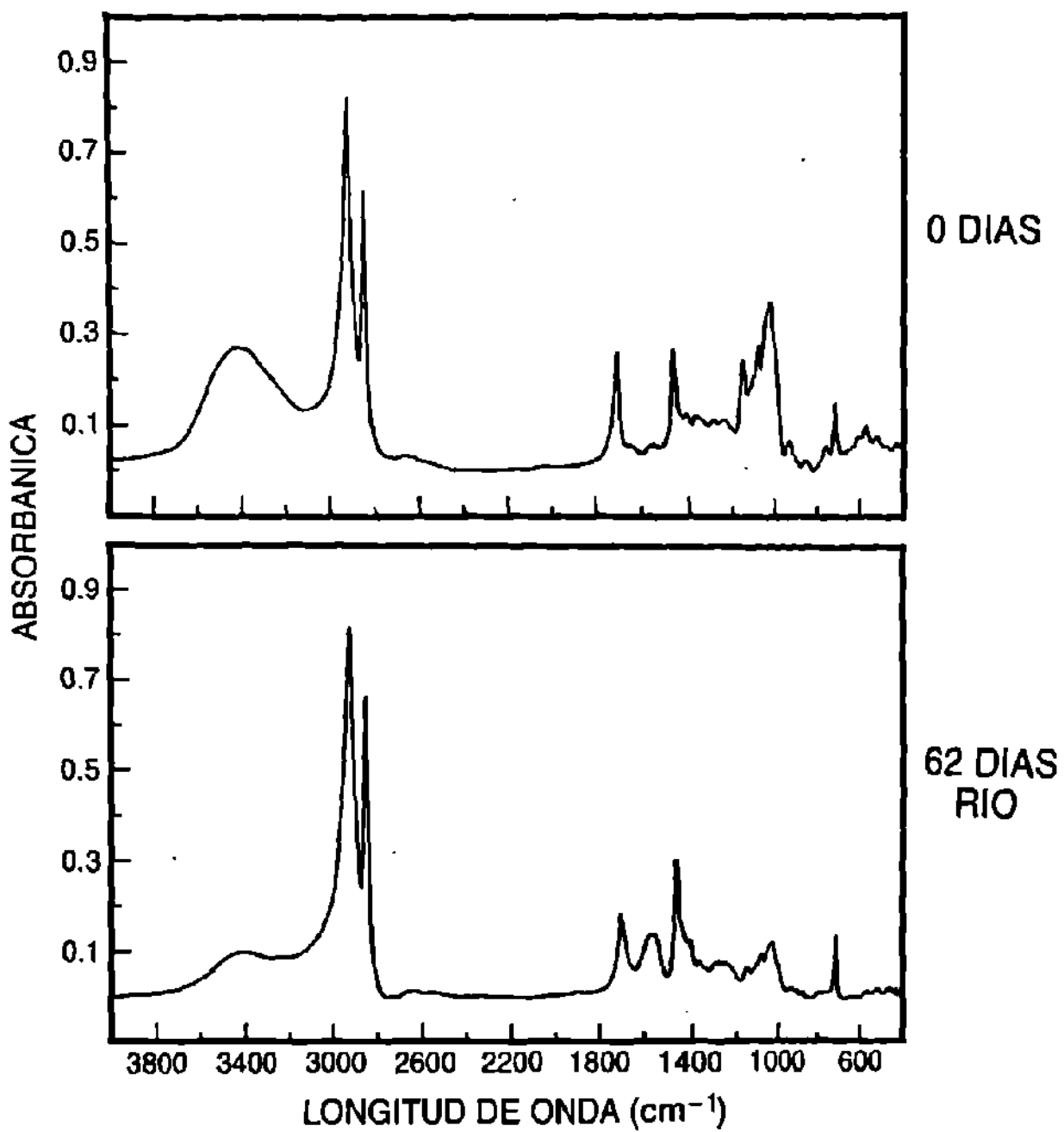


39.- Espectros de IRTF de los formulados F3 y F7 (grupo de quitina), antes y después de ser expuesto a los diferentes ecosistemas de estudio.



40.- Espectros de IRTF del formulado F4 (grupo de pululan), antes y después de 62 días de exposición en río.

F4



41.- Espectros de IRTF de los formulado F5 y F8 (grupo de pectina), antes y después de ser expuesto a los diferentes ecosistemas de estudio.

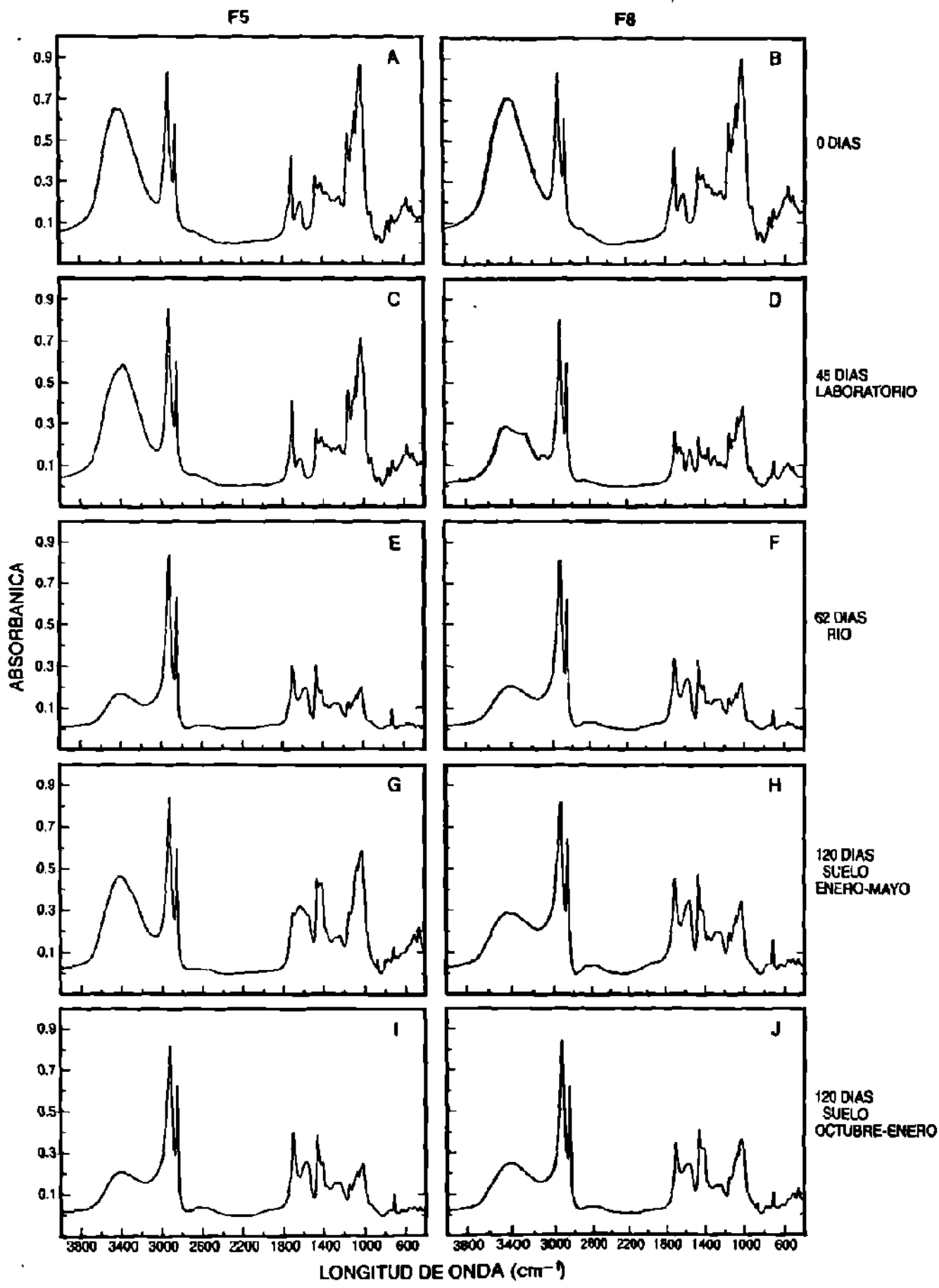


Tabla 22.- Porcentaje de pérdida en absorbancia en la región del grupo OH y del grupo C-O en la región de la huella digital correspondientes a los carbohidratos presentes en las membranas formuladas.

FORMULADO	SISTEMA	OH*	C-O*	Amida I*	COOH*
ALMIDON F1	LABORATORIO	32.20	31.25		
	RIO	67.79	60.0		
	SUELO ^a	77.96	62.5		
	SUELO ^b	85.59	82.50		
F2	LABORATORIO	7.93	15.05		
	RIO	23.80	15.05		
	SUELO ^a	30.15	33.33		
	SUELO ^b	50.79	51.61		
F6	LABORATORIO	16.92	13.97		
	RIO	18.46	19.35		
	SUELO ^a	35.38	9.67		
	SUELO ^b	75.38	72.04		
QUITINA F3	LABORATORIO	-	-		
	RIO	56.08	55.55	55.55	
	SUELO ^a	24.32	33.33	12.69	
	SUELO ^b	36.48	27.77	12.69	
F7	LABORATORIO	15	11.92	79.24	
	RIO	66.25	67.88	43.39	
	SUELO ^a	57.5	66.97	38.67	
	SUELO ^b	73.75	67.88	33.96	
F4	RIO	67.64	72.34		
PECTINA F5	LABORATORIO	10.12	18.01		13.33
	RIO	73.41	77.47		35
	SUELO ^a	29.11	33.33		38.33
	SUELO ^b	68.35	71.17		15
F8	LABORATORIO	58.82	57.01		43.33
	RIO	70.58	75.87		28.33
	SUELO ^a	58.82	61.45		3.33
	SUELO ^b	65.88	60.52		28.33

* Valores dados en %

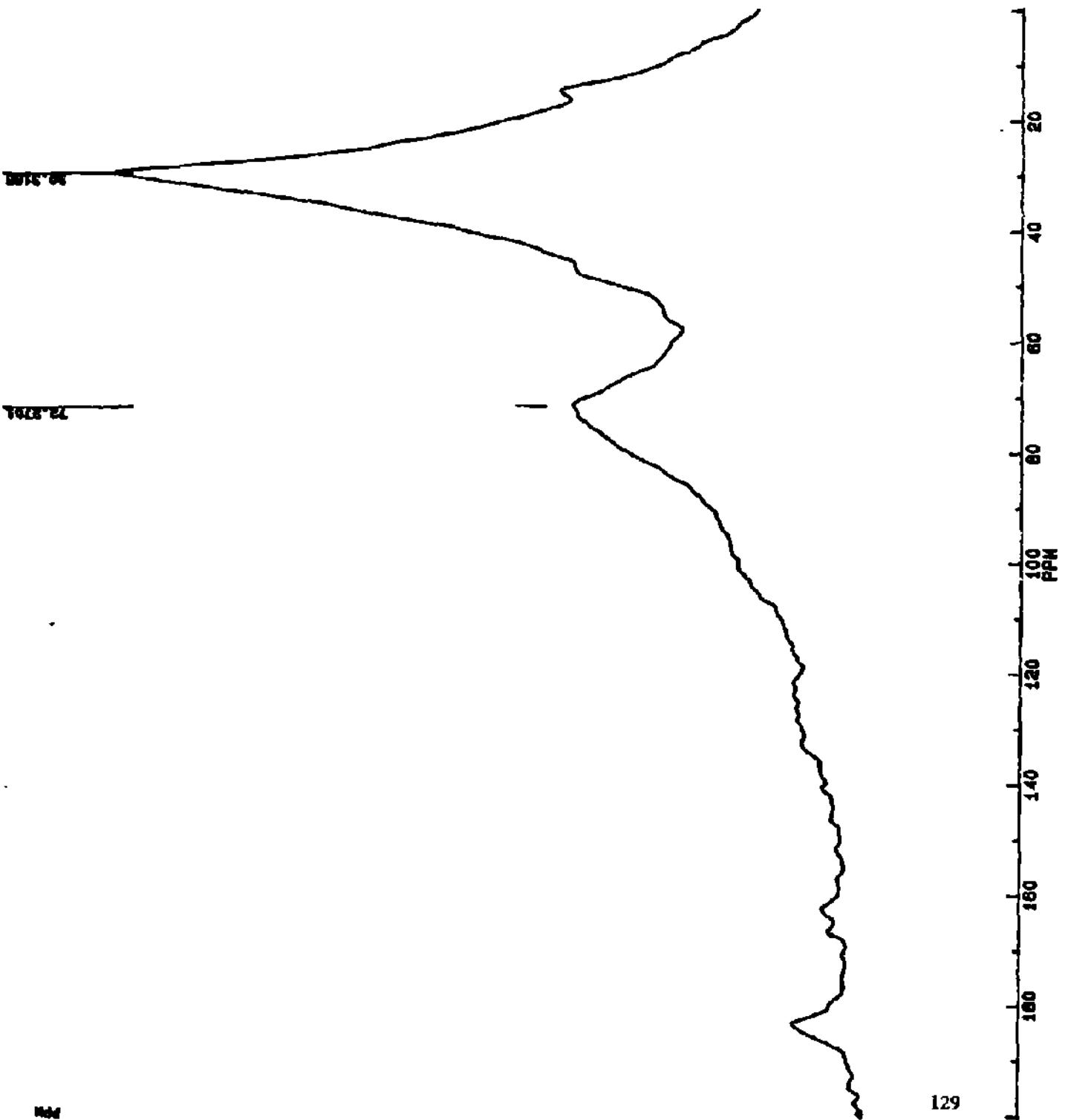
^a Experimento realizado de Enero a Mayo'94

^b Experimento realizado de Octubre'94 a Enero'95

42.- Espectros de CP/MAS ^{13}C -NMR del formulado F1 (grupo almidón), antes y después de 62 días de exposición en río.



STASCHIE.505
 AV: PNRROUT
 PP8: CPCYCL.PC
 DATE 17-8-93
 SF 75.470
 O1 -1900.000
 TD 1024
 SM 50000.000
 RB 20
 NS 5602
 RD 4000
 TE 288
 O2 -75000.000
 O0 5.0008
 O1 7.0000
 O3 800.0000
 BR -2922.81



72.3291

72.3291



SIASCHIE.400

AU:

POWRUIT

PPB:

CPCYCL.PC

DATE 10-8-93

SF 76.470

O1 -1900.000

Y0 1024

SW 50000.000

RG 20

NS 4558

RO 3560

TE 286

O2 -7856.000

O0 5.0005

O1 7.0000

O5 500.0000

SR -2436.30

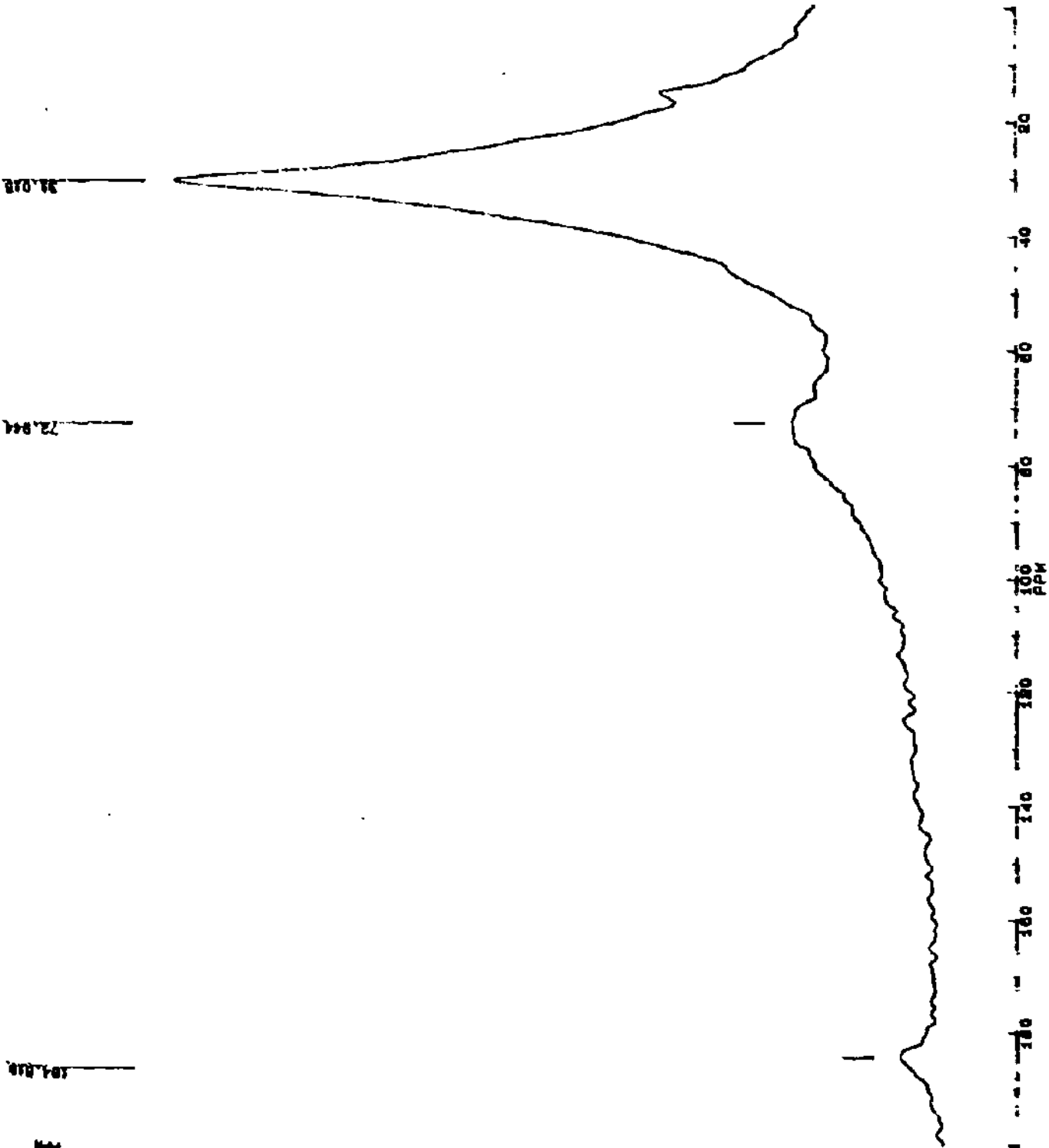
SI AND 4 STARCH EXP

31.018

72.844

104.810

76



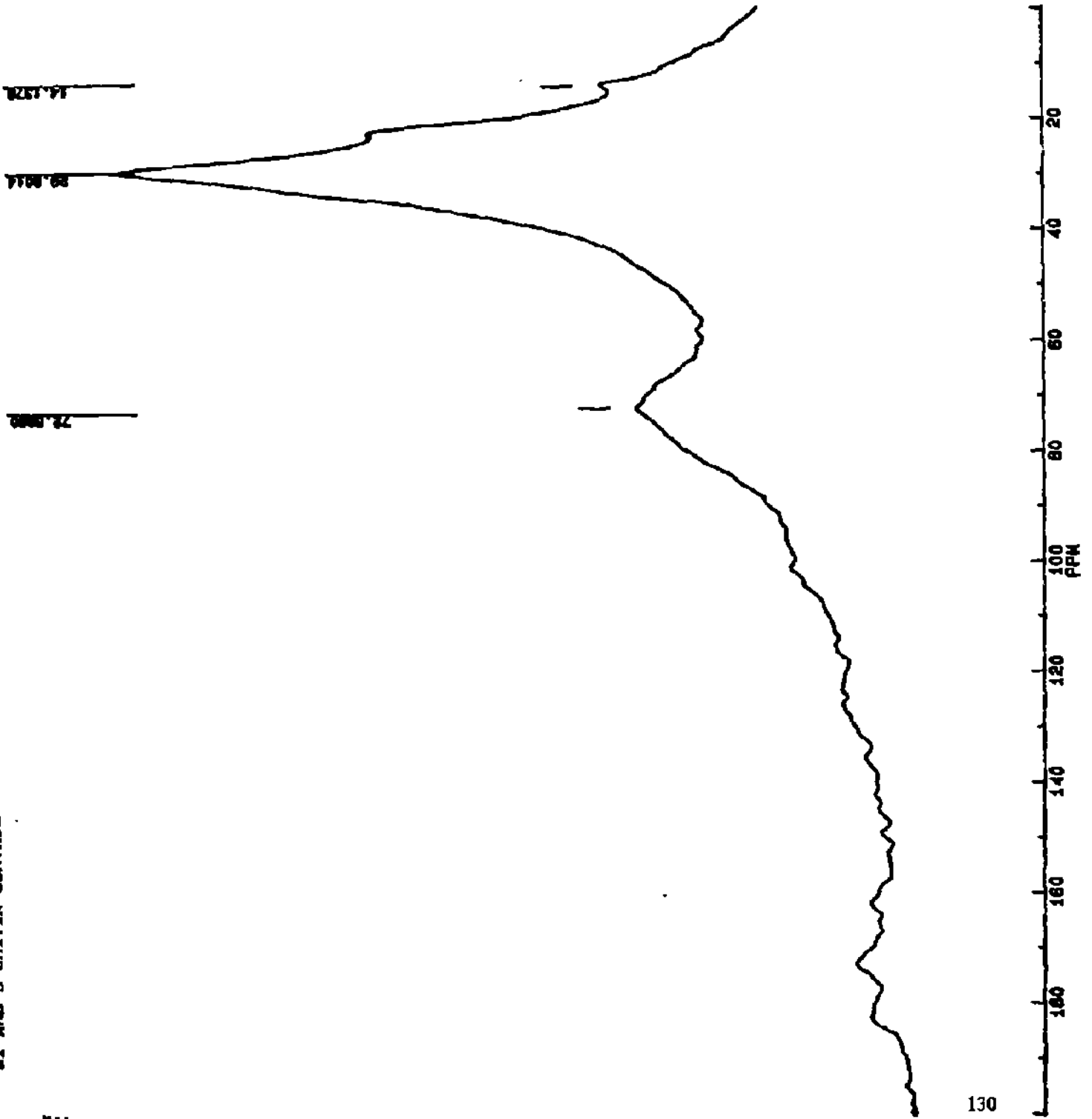
100 PPM
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180

43.- Espectros de CP/MAS ^{13}C -NMR del formulado F1 (grupo quitina), antes y después de 62 días de exposición en río.

E



STARCHIE.204
 AU: POWROUT
 PP6: CPCYCL.PC
 DATE 5-8-83
 SF 75.470
 O1 -1900.000
 TO 1024
 SN 80000.000
 RB 20
 NB 5534
 RO 3550
 TE 288
 O2 -7555.000
 O0 8.0008
 O1 7.0000
 O8 800.0000
 BR -2922.91



E



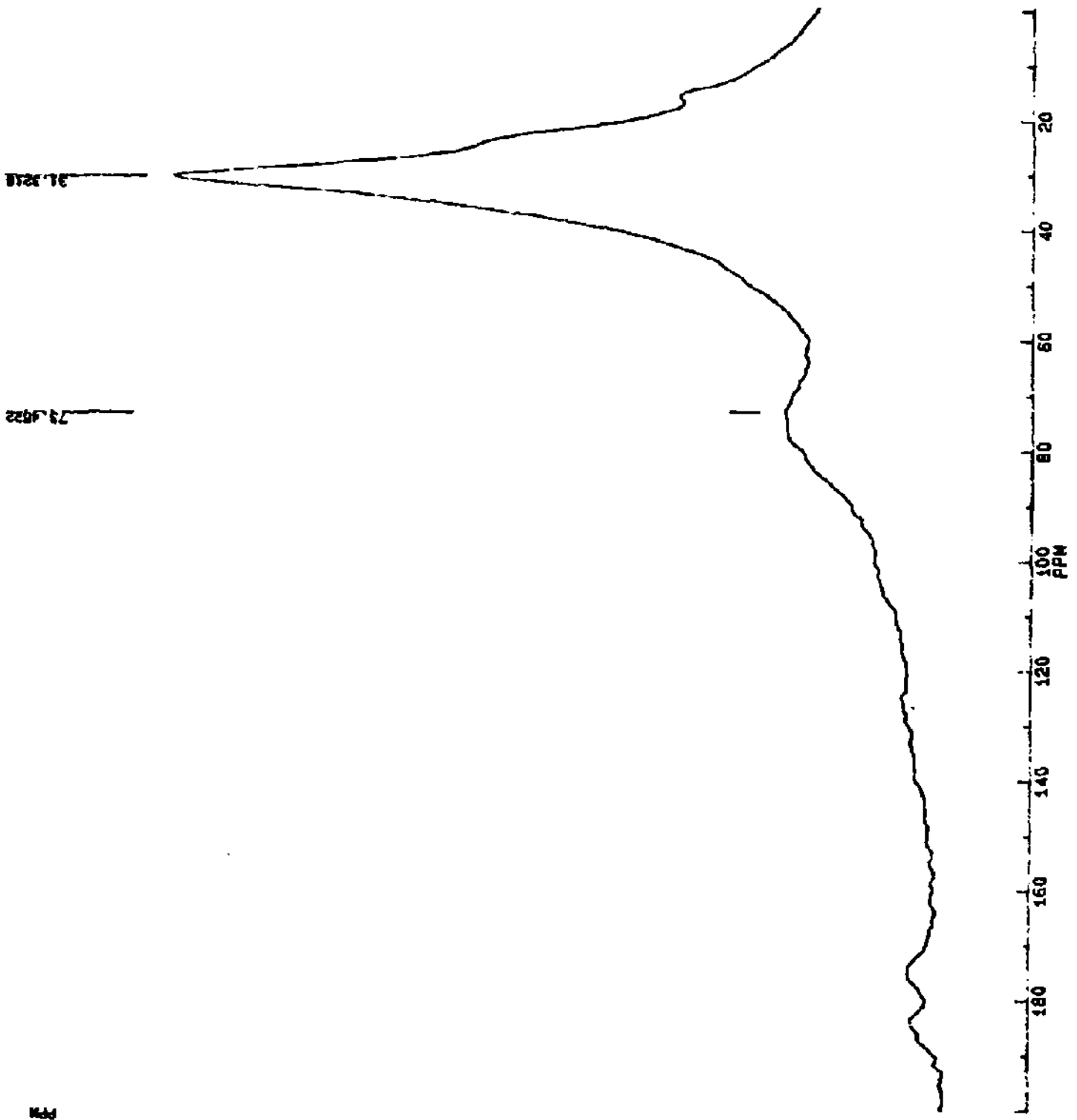
SIACHIE.004
 AU: POMROUT
 PRG: CPCYCL.PC
 DATE 29-7-93

SF 75.470
 O1 -1900.000
 TO 1024
 SW 80000.000

RS 20
 NS 6118
 RO 3560
 TE 296

O2 -7556.000
 DO 5.0008
 OI 7.0000
 OS 600.0000

SA -2438.30

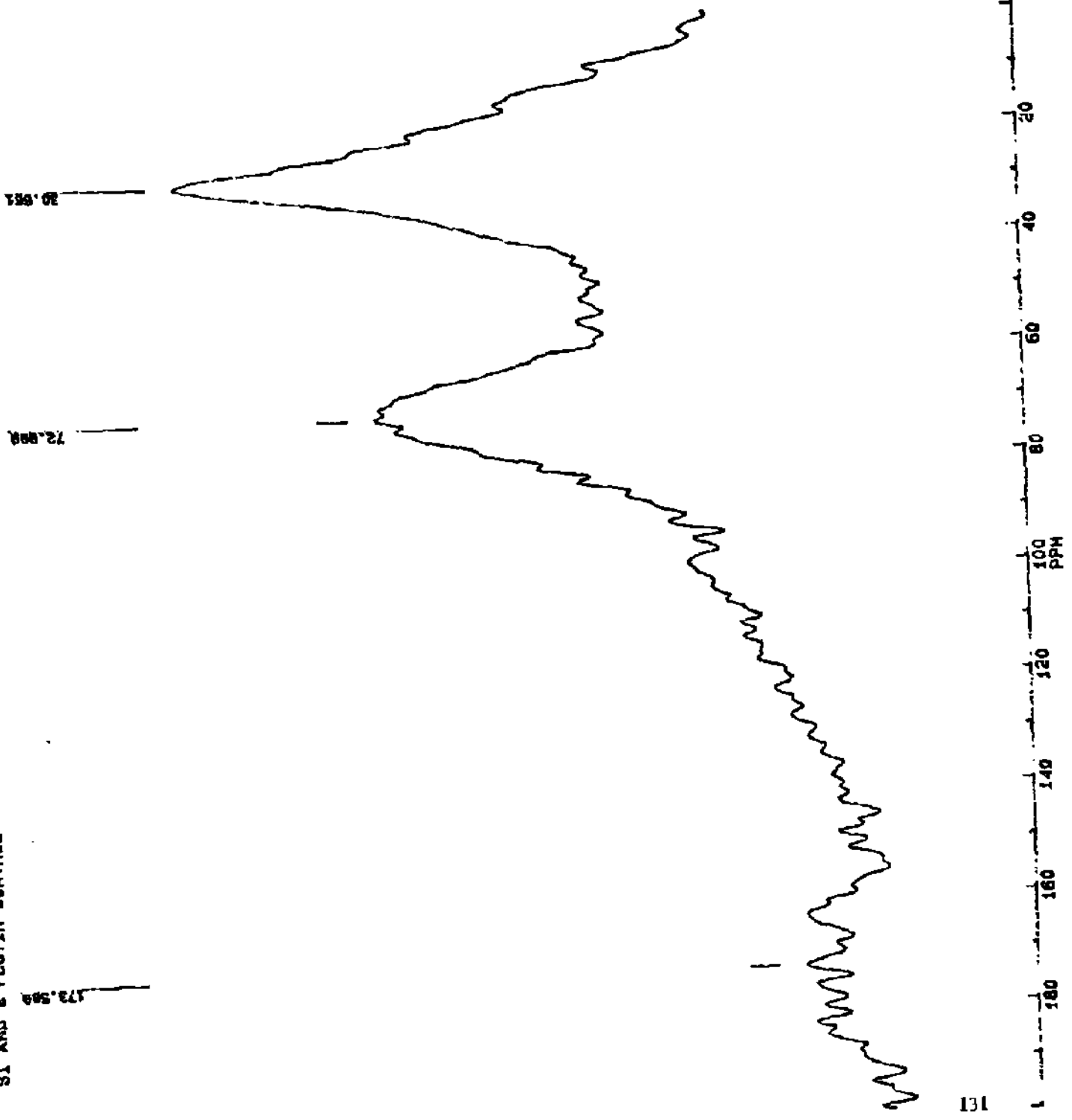


44.- Espectros de CP/MAS ^{13}C -NMR del formulado F5 (grupo almidón), antes y después de 62 días de exposición en río.

SI AND 2 PECTIN CONTROL



SIASCHIE.300
 AU: POMRROT
 PPG: CPCYCL.PC
 DATE 6-8-83
 SF 75.470
 O1 -1800.000
 TD 1024
 SW 60000.000
 RG 20
 NS 2286
 RO 3560
 TE 296
 O2 -7256.000
 O0 5.0009
 O1 7.0000
 O5 800.0000
 SR -2436.39



E



BIACHTIE.101
 AU: POMROUT
 PPB: CPCYCL.PC
 DATE 2-8-93
 SF 75.470
 O1 -1800.000
 TO 1024
 SM 80000.000
 RS 20
 NS 3181
 RO 3550
 TE 298
 O2 -7556.000
 O0 5.0006
 O1 7.0000
 O5 500.0000
 SA -2322.91

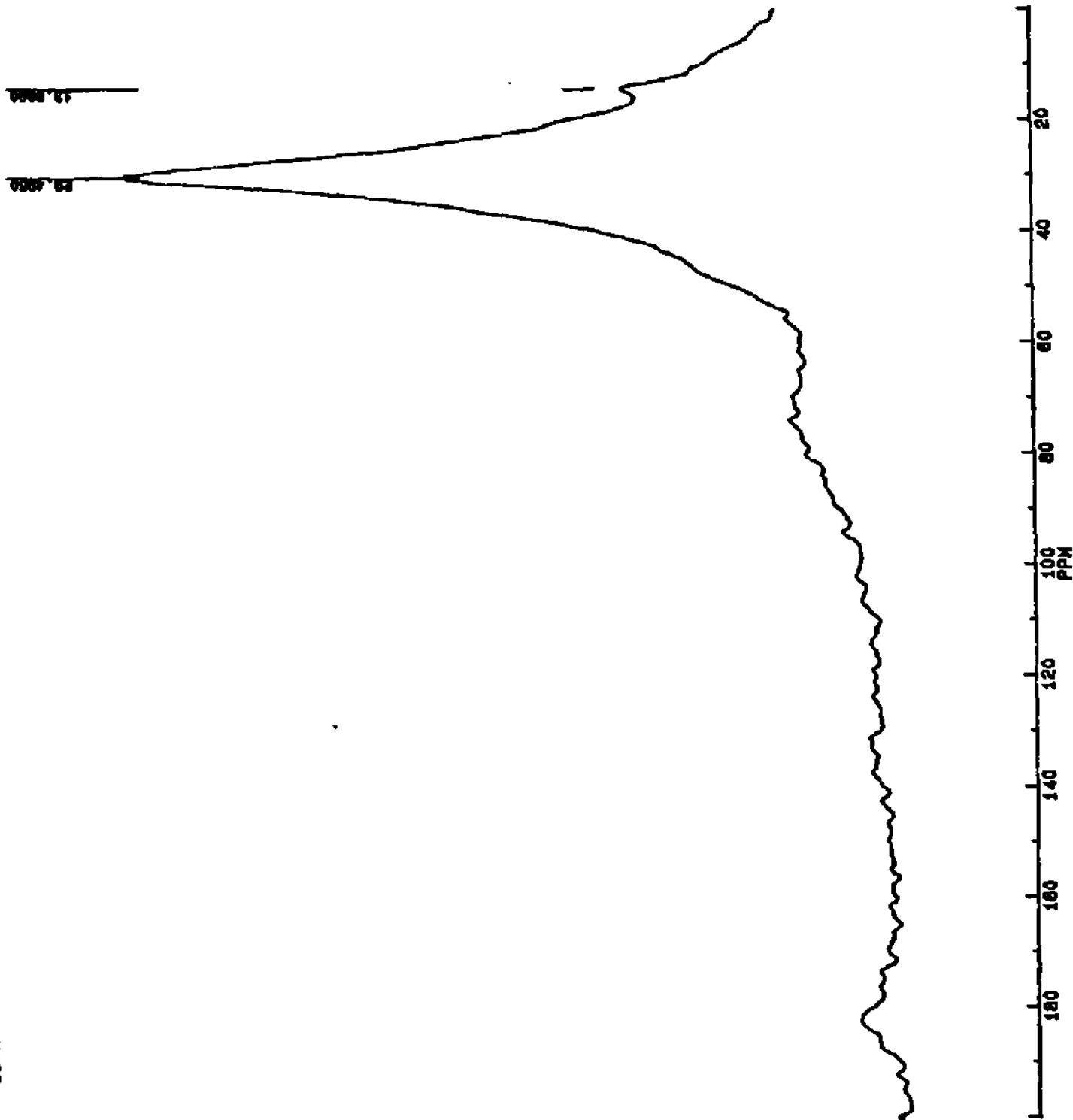


Tabla 23.- Porcentaje de pérdida en el contenido de carbohidratos estimado por CP/MAS ¹³C-NMR de muestras recuperadas del Experimento de río a los 62 días de exposición.

Formulado	Area		Proporción		Pérdida del contenido de carbohidrato (%)
	70 ppm	Total	70 ppm	30 ppm	
F1 (Almidón)	60	300	1:4		80%
F7 (Quitina)	12	87	1:6		86.25%
F5 (Pectina)	30	220	1:6.3		86.38%

DISCUSIÓN

Los plásticos biodegradables elaborados a base de polímeros naturales, ya sea polisacáridos, proteínas o materiales de reserva producidos por microorganismos (PHAs), es una realidad de este siglo. La búsqueda de nuevos polímeros para la elaboración de estos materiales que presenten las propiedades de biodegradabilidad así como la factibilidad de elaborar productos con propiedades muy similares a los plásticos sintéticos, forma parte de las metas planteadas por los investigadores en este campo. Estudiar la biodegradabilidad de los materiales elaborados con estos polímeros mediante métodos en vías de estandarización no es una tarea fácil, sin embargo cada vez los métodos son más específicos y con mayor sensibilidad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de polisacáridos naturales como quitina, pectina y pululan para elaborar plásticos biodegradables al mezclarse con almidón y polímeros sintéticos probando posteriormente su biodegradabilidad en diferentes ecosistemas.

Los datos obtenidos demuestran que es posible obtener membranas plásticas a partir de diversas formulaciones preparadas con los polímeros en estudio, las cuales no presentaron propiedades físicas comparables con nuestros controles elaborados con 100% de polímeros sintéticos; sin embargo se puede observar que las formulaciones denominadas del grupo de almidón muestran valores de % de elongación iniciales muy aceptables en comparación con los otros formulados, aunque la fuerza de tensión es muy similar para todos. Esto nos indica que las membranas obtenidas fueron flexibles y débiles, es decir poca resistencia para el grupo de almidón; para quitina fueron suaves y débiles y para pectina

resultaron ser duras y quebradizas (Briston y Katan, 1974). En cuanto a la adición de PEG como plastificante, al menos para las propiedades físico-mecánicas, se pudo observar que en los formulados donde se adicionó se vio incrementado el % de elongación, efecto mas evidente en los formulados del grupo de pectina.

Para las pruebas de biodegradabilidad en los diferentes ecosistemas, nuestros resultados indicaron en los estudios de laboratorio, una mayor pérdida en peso en los formulados a base de pectina, seguido del grupo de almidón y finalmente quitina, tanto para el experimento con el consorcio bacteriano LD-76, como con *Serratia marcescens*. Para el grupo de almidón se pudo observar con ambos microorganismos que el formulado F1, el cual contenía en su formulación 25% de cada uno de los polímeros sintéticos (PEBD y EAA), fue el que presentó mayor porcentaje de pérdida en peso, y que F2 cuya formulación contenía 50% de EAA presentó los valores más bajos de este grupo. Esto coincide con los trabajos de Shogren, 1992 quien reporta que el copolímero de etilen-ácido-acrílico forma complejos denominados tipo V con el almidón, lo cual deja inaccesible el polisacárido para ser degradado por los microorganismos. En el caso del grupo de pectina, F5 mostró valores más altos que F8 y para los formulados con quitina F7 perdió más peso que F3, en ambos experimentos. Los controles F9 y F10 para ambos sistemas no indicaron pérdida en peso. Sin embargo, aunque se presentaron valores ligeramente mayores de pérdida en peso para todos los formulados con polímeros naturales en el experimento con *Serratia marcescens*, la variabilidad de los datos fue mayor al trabajar con este microorganismo, como se puede observar con F6 del grupo de almidón el cual contrario a lo esperado presentó ganancia de

peso durante el experimento. En general se pudo observar que la presencia de polietilenglicol no influyo para que formulados que lo presentaran tuvieran más pérdida en peso.

Se encontró diferencia significativa para este parámetro entre los grupos de formulados, representando los diferentes grados de susceptibilidad de estos formulados a perder peso, bajo las condiciones de laboratorio, considerado como un indicativo de biodegradabilidad. Para la variable tiempo, cuando se analiza independientemente del formulado parece no influir en la pérdida de peso, es decir que la pérdida en peso no se incrementa con el tiempo. Sin embargo cuando se estudia interactuando con el tipo de formulado si hay diferencia significativa, por lo que consideramos que probablemente el tiempo que duraron los experimentos no fue el suficiente para dar una conclusión sobre esta variable y que lo más indicado sería analizarse interactuando con el factor formulado, ya que el tipo de formulado es la variable de mayor interés.

En el caso del experimento control para este sistema, en donde se colocaron muestras de los diferentes formulados en el medio de cultivo, en agitación y sin inocular, se obtuvieron datos de pérdida en peso para todos los formulados que contenían ese polisacárido, aunque en menor proporción a las muestras probadas con los diferentes microorganismos. Esta pérdida fue mayor en el grupo de pectina, posteriormente quitina y finalmente almidón. Estos resultados indican que hubo pérdida en peso muy probablemente por una degradación hidrolítica de los polisacáridos ya que en los formulados con polímeros sintéticos no se presentó pérdida de peso. Esto difiere a lo reportado por otros autores los cuales no reportaron pérdida en peso en sus controles negativos (Gould *et al*, 1990), sin embargo ellos utilizaron formulados con almidón como único polisacárido y en nuestro caso

tenemos formulaciones con más de un polisacárido, de los cuales se sabe son altamente hidrofílicos. Lo que observamos es que los formulados con almidón para este caso fueron los que presentaron menor pérdida en peso.

En el experimento de río se presentó la mayor pérdida en peso comparado con los otros ecosistemas y similarmente a los experimentos de laboratorio, el grupo de pectina fue el primero seguido del formulado de puhulan, posteriormente el grupo de almidón y por último de quitina, no presentando pérdida en peso significativa los controles. Se obtuvo una alta diferencia significativa entre los formulados en relación a este parámetro, indicando nuevamente los diferentes grados de susceptibilidad a perder peso entre las diferentes formulaciones. En el grupo de almidón el formulado con mayor contenido de EAA (F2), fue el que tuvo menor pérdida en este parámetro, similar a los resultados en los experimentos de laboratorio.

En relación a los factores ambientales se observó que el pH del agua se mantuvo con valores neutros, la temperatura templada (2.4°C), y el número de microorganismos presentó ligeros incrementos durante el transcurso del experimento con un promedio de 47.05×10^2 células por ml.

En los experimento de suelo realizados en dos fechas diferentes, (Enero a Mayo de 1994) y (Octubre de 1994 a Enero de 1995), no se pudieron recuperar las muestras en condiciones para medir este parámetro. Se pudo observar que en el experimento realizado en el período de Octubre'94 a Enero'95, la pérdida en peso fue ligeramente mayor para todos los formulados que pudieron analizarse, en comparación con el experimento de Enero a Mayo de 1994. La prueba de rango múltiple de Tuckey para el experimento de

Enero a Mayo '94, indicó cuatro diferentes grupos de homogeneidad; quedando el grupo de almidón y los controles F9 y F10 como los de menor pérdida en peso, posteriormente el grupo de pectina y finalmente quitina. No fue posible realizar el mismo análisis para el otro experimento por no tener suficiente número de repeticiones.

El análisis fisicoquímico del suelo indicó un suelo de tipo franco arcilloso. El análisis estadístico, (Prueba de Kolmogorov-Smirnoff) de los parámetros de pH, humedad y temperatura del suelo obtenido en ambos experimentos indicaron que únicamente el factor humedad presentó correlación con la pérdida en peso.

La determinación de crecimiento microbiano en los experimentos de laboratorio, con LD-78 indicaron un incremento en la población para todos los formulados excepto en los controles F9 y F10. Se observó que en la mayoría se alcanzó el máximo número de microorganismo a los 30 días, bajando posteriormente la población. Esto pudo deberse posiblemente al agotamiento de la fuente de carbono o que después de haberse consumido una parte, por los cambios estructurales del formulado, el polisacárido restante quedó inaccesible al microorganismo. En el caso de *Serratia marcescens* no se pudo determinar un claro incremento en la población ya que en todos los formulados se observaron fluctuaciones en el número de células por ml de medio de cultivo. La finalidad de esta determinación fue tratar de encontrar una relación entre la pérdida de peso en los formulados y el número de microorganismos presentes, lo cual no se presentó. Sin embargo consideramos que la utilización de la fuente de carbono, en este caso los polisacáridos, para el crecimiento de los microorganismos, va a depender de muchos factores como la accesibilidad de dicha fuente, si la o las enzimas del microorganismo son inducibles o constitutivas, etc.

En los experimentos realizados en río y suelo se determinó la flora adherida a las muestras recuperadas, se observó que en el experimento de río el mayor número de microorganismos se presentó en las muestras con quitina, posteriormente pectina, almidón, puhulan y el menor número se encontró en los controles F9 y F10. En el experimento de suelo realizado de Enero a Mayo '94 se observó el mismo patrón excepto con puhulan 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. Existen reportes donde se indica que no existe una dependencia de la adhesión de los microorganismos con la capacidad de utilización del sustrato (Imam, 1990), por lo que es aceptable no haber encontrado el mayor número de microorganismos en los formulados con pectina.

Las muestras recuperadas de los experimentos de laboratorio con LD-76 y de suelo se analizaron para determinar las propiedades fisico-mecánicas que presentaron después de haber estado en contacto con los microorganismos. Para el experimento en laboratorio todos los formulados presentaron un decremento en el % de elongación; esto significa que los formulados cambiaron para hacerse duros al perder elasticidad excepto F5, del grupo de pectina, el cual tuvo un incremento del 37.78% y F9 del grupo control con un incremento de 66.13%. Para el parámetro de fuerza de tensión los resultados fueron más variables, así tenemos que en el grupo de almidón F1 disminuyó levemente en comparación con F2 y F6 los cuales presentaron incrementos arriba del 100%, indicando que se tornaron resistentes pero quebradizos ya que su elongación fue baja; para quitina F3 disminuyó mientras que F7

aumentó en 188.36%. Los formulados del grupo de pectina, ambos se volvieron duros y quebradizos al verse incrementada su fuerza de tensión y disminuido su % de elongación.

Para ambos experimentos de suelo, el parámetro de % de elongación disminuyó para la mayoría de los formulados excepto en los controles F9 y F10 donde se vio incrementado. La fuerza de tensión presentó un comportamiento más homogéneo en el experimento realizado en Octubre '94-Enero '95 donde disminuyó para todos los formulados, mientras que en el experimento de Enero-Mayo '94, F1, F5 y F7 mostraron incrementos en este parámetro. La mayoría de los estudios de biodegradabilidad donde se han medido los cambios en estas propiedades fisico-mecánicas como un indicio de biodegradación, se han realizado con almidón como único polímero natural o con almidón y PHBV, en donde se ha observado que ambos parámetros presentan decremento en sus valores iniciales (Gould, 1990), de igual forma para los plásticos elaborados con polímeros sintéticos el comportamiento esperado de estos parámetros después de pruebas de envejecimiento ya se conoce que es decremento de sus valores iniciales. No conocemos la razón por la cual en nuestros resultados se presentó variabilidad en la fuerza de tensión pero suponemos que diferencias en el espesor de las muestras iniciales con respecto a las muestras recuperadas de los experimentos pudo ser una razón, además de no existir antecedentes acerca del comportamiento de estas mezclas de polímeros después de su degradación.

En el análisis de microscopía electrónica de barrido realizado a las muestras de río después de 62 días de exposición, se observó deterioro en la superficie de las muestras a base de polisacáridos así como la acumulación de microorganismos (principalmente bacterias) sobre estas, en comparación con los controles. Sin embargo, la acumulación de

microorganismos no fue considerado como un indicio de biodegradación, ya que como se menciono anteriormente la adhesión no es un requisito para que exista biodegradación ya que la degradación puede realizarse a través de enzimas extracelulares difusibles.

Finalmente los análisis de espectrofotometría de infrarrojo confirmaron los resultados obtenidos de pérdida en peso. Se pudo observar como los espectros característicos de los controles a base de polímeros sintéticos (PEBD y EAA) no presentaron cambios en las bandas de absorción características de los enlaces C-H y C=O , en ninguno de los experimentos realizados. Al analizar los espectro de los polisacáridos utilizados, observamos que todos ellos presentan la banda característica del enlace OH, y del enlace C-O en la región de la huella digital. Los formulados a base de pectina y el de puhulan presentaron además, una banda de absorción correspondiente al grupo carboxilo COOH, y los de quitina la banda correspondiente al grupo amida I, los cuales se utilizaron posteriormente para el análisis cuantitativo. En el grupo de almidón se observó disminución en la absorción de la banda correspondiente al enlace C-O primeramente en F1, posteriormente en F6 y finalmente en F2, esto coincide con los resultados obtenidos de pérdida en peso. Se observo que valores muy similares se obtienen al analizar la disminución de absorción en la banda correspondiente al grupo OH, lo que podría indicarnos que no existia presencia de agua en las muestras. Para los tres formulados la mayor disminución en absorción se presentó en el experimento de suelo realizado en Octubre'94-Enero'95, seguido del experimento de suelo de Enero-Mayo'94 luego el experimento de río y finalmente el de laboratorio. En el grupo de quitina para F3, la disminución en la absorción de las bandas del enlace C-O y del grupo

amida I, fue mayor en el experimento de río, y para F7 valores muy similares se encontraron entre río y suelo (Octubre'95-Enero'95), tanto para el grupo C-O como para amida I.

En el grupo de pululan solamente se analizó la muestra del experimento de río observándose la disminución en las bandas del grupo C-O y COOH.

El grupo de pectina que fue el que presentó la mayor pérdida en peso en todos los ecosistemas, presentó disminución tanto en el grupo C-O como para el carboxilo COOH, teniendo la mayor disminución en el experimento de río para ambos formulados F5 y F8, seguido de los experimento de suelo y finalmente en laboratorio.

En todos los formulados de los dos experimentos de suelo, el realizado en el período de Octubre'94 a Enero'95, fue donde hubo mayor disminución de absorción del grupo C-O, mismo período en donde hubo la mayor pérdida en peso.

Para todos los formulados en los que se analizó el grupo funcional característico, ya sea COOH o amida I, además del grupo C-O, la disminución fue mayor en el grupo C-O que para los otros grupos, lo que indicaría que del total de polisacárido que contenía el formulado, que en todos era 40%, la mayor parte que fue degradada correspondía al almidón presente.

Los estudios de resonancia magnética nuclear se realizaron a un formulado representativo de cada grupo. Este análisis nuevamente corrobora los resultados de pérdida en peso y de espectrofotometría de infrarrojo, en donde el grupo de pectina, representado por el formulado F5, del total de carbohidrato que contenía (40%), perdió el 86.38%; el grupo de quitina, en F7 perdió el 86.25% y F1 del grupo de almidón, perdió el 80%. El grado de sensibilidad de esta técnica nos permitió determinar la cantidad de carbohidrato

presente en las muestras recuperadas y conociendo la cantidad inicial del mismo estimar la cantidad perdida.

La integración de los resultados obtenidos por las diferentes metodologías nos indican que si se presentó degradación de nuestros formulados en los diferentes ecosistemas probados, que esta degradación varió dependiendo del tipo de formulado así como del ecosistema probado. Destacando los formulados a base de pectina los cuales tuvieron mayor degradación en ambientes acuáticos debido probablemente a su naturaleza altamente hidrofílica. Los formulados a base de quitina resultaron con mayor degradación en suelo ya que en este tipo de ecosistemas las poblaciones quitinolíticas son abundantes. En cuanto a los formulados de pululan presentaron solubilización en el medio de cultivo después de 24 h, razón por la cual no se tienen resultados de este formulado en laboratorio. Del experimento de río ésta muestra se pudo recuperar ya que se encontraba entre dos rejillas plásticas las que le ayudaron a mantener su estructura relativamente. Los formulados a base únicamente de almidón fueron los que presentaron las mejores propiedades físicas de todos los probados además de los controles, y su degradabilidad fue superada solo por las muestras con pectina. El hecho de presentarse pérdida en peso en los controles negativos de laboratorio, la alta solubilidad de los polisacáridos, la presencia de microflora adherida a las muestras, y finalmente el análisis cuantitativo que determinó la cantidad de polisacárido degradado nos lleva a concluir que los mecanismos por los cuales se presentó la pérdida de los diferentes polisacáridos en las formulaciones son procesos físicos, químicos y microbiológicos. Que porcentaje de cada proceso fue el que intervino en dicha degradación ?, es un análisis difícil de hacer, pero consideramos que uno proceso no puede suceder sin la presencia de los otros.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos hacer las siguientes conclusiones:

1.- Es posible obtener membranas plásticas partir de mezclas de polímeros sintéticos como PEBD y el copolímero de EAA con polímeros naturales como almidón, quitina, pectina y pululan, utilizando el método semiseco de Otey.

2.- Las propiedades fisico-mecánicas de estas membranas obtenidas no son comparables a las propiedades de membranas a base de polímeros sintéticos.

3.- El polietilenglicol adicionado como plastificante incrementó levemente el % de elongación en las formulaciones en donde este se adicionó no teniendo efecto en la biodegradabilidad de las membranas.

4.- La presencia de EAA en mayor concentración (50%) en el formulado F2 del grupo 1 de almidón, provocó que presentara menor degradación que los formulados F1 y F6 que contenían 25% ; esto probablemente por la presencia de inclusiones o complejos tipo V los cuales se forman entre el almidón y el copolímero.

5.- La adición de pectina o quitina a los formulados con almidón incrementó la biodegradabilidad de las membranas, en comparación a las membranas que solo tenían almidón como polisacárido dependiendo del sistema donde se probaron.

6.- La formulación de almidón con pectina presentó la mayor biodegradabilidad en la mayoría de los ecosistemas probados, excepto en suelo donde los formulados a base de almidón y quitina tuvieron mayor biodegradación.

7.- La biodegradabilidad de los formulados fue más evidente en los ecosistemas naturales que en laboratorio.

8.- El parámetro de pérdida en peso es una forma indirecta de medir degradación y debe ser apoyado por técnicas más específicas y de mayor sensibilidad como espectrofotometría de infrarrojo, de resonancia magnética nuclear, cromatografía de permeación en gel, etc.

9.- El mecanismo de degradación que actuó sobre las membranas elaboradas con los diferentes polisacáridos fue la interacción de procesos físicos, químicos y microbiológicos.

RECOMENDACIONES

Las conclusiones obtenidas de este trabajo nos permiten hacer las siguientes recomendaciones para continuar la investigación en relación a esta línea:

- 1.- Probar diferentes proporciones de los componentes en las formulaciones desarrolladas, para mejorar las propiedades físico-mecánicas de las membranas que se obtengan.
- 2.- Realizar estudios similares a este trabajo con muestras obtenidas por el método de moldeado por inyección para determinar si el procesamiento de las formulaciones afecta la biodegradabilidad de las mismas.
- 3.- Repetir este estudio con formulaciones donde se utilicen los polisacáridos (pectina y quitina) grado industrial, provenientes de la industria nacional.
- 4.- Sustituir la quitina por quitosan para probar si se mejoran las propiedades físico-mecánicas y de biodegradabilidad de los formulados.
- 5.- Realizar estudios de biodegradabilidad de estas formulaciones en otros ecosistemas como rellenos sanitarios, composta sistemas acuáticos que no están en movimiento, como lagos y presas.

6.- Estandarizar la técnica de Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformadas de Fourier para la determinación simultánea de múltiples componentes en este tipo de biopolímeros.

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1980.** Cap. 13: Microbiología de otros polisacáridos. En: *Introducción a la Microbiología del Suelo*. AGT, Editor, S.A. México, D.F. pp.203-217.
- Allan, G.C., Fox, J.R. y H. Kong. 1978.** *A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan.* Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan". R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds). MIT Sea Grant Program, Cambridge, MA.296-305.
- Allenza, P., Schollmeyer, J. y R. P. Rohrbach. 1990.** Interaction of microbial enzymes with degradable components of plastics. En: *"Corn Utilization Conference III Proceedings"*. pp. 1-4.
- Andrady, L.A., Pegram, J.E. y S. Nakatsuka. 1993.** Studies of enhanced degradable plastics:1. The Geographic variability in outdoor lifetimes of enhanced photodegradable polythylenes. *J. Environ. Polym. Degr.* 1: 31-43.
- Asha, V. y R. Bartha. 1994.** Methods for assessment of biodegradability of plastic films in soil *Appl. Environ. Microbiol.* 60: (10) 3608-3614.
- Augusta, J., Müller, R. y H. Widdecke. 1993.** A rapid evaluation plate-test for biodegradability of plastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 673-678.
- Averbach, B.L. 1978.** Film-forming capability of Chitosan. En: *"Muzzarelli and Pariser"*. pp.199-204.

- Bade, M.L y R.L. Wick. 1988. Protecting crops and wildlife with chiting and chitosan.**
 Cap. 31. En: "Biologically Active Natural Products. H.G. Cutler (Ed.) ACS
 Symposium Series. American Chemical Society. Washington, D.C. pp. 450-468.
- Barrón, U. E. 1989. Polímeros, Estructura, Propiedades y Aplicaciones. Ed. Limusa,**
 Noriega S.A. de C.V. México, D.F. pp. 9-12.
- Breant P. y Y. Aitken. 1990. Regulations and Standards in Europe. En: Biodegradable
 Polymers and Plastics. M. Vert (ed.) Royal Society of Chemistry. Great Britain.**
 pp.165-168.
- Breslin, V.T. 1993. Degradation of starch-plastics composites in a municipal solid waste
 landfill. J. Environ. Polym. Degr. 1: (2) 127-141.**
- Breslin, V.T. y R.L. Swanson. 1993. Deterioration of starch-plastics composites in the
 environment. Air & Waste. 43: 325-335.**
- Breslin, V.T., y Boen Li. 1993. Weatheing of Starch/Polyethylene Composite Films in the
 Marine Environment, Journal of Applied Polymer Science. 48: 2063-2079.**
- Briston, J.H. y L.L.,Katan. 1974. Cap. 9: Mechanical Properties. En: Plastics Films. John
 Wiley & Sons, New York Toronto pp. 83-102.**
- Bohlmann, G., Daniels P.-J. y Y. Yoshida. 1995. Biodegradable Polymers. Chemical
 Economics Handbook. (CEH). pp. 580.**
- Bourque, D., Pomerleau, Y. y D. Groleau. 1991 . High Cell Density Production of PHB
 Using Methanol in a Fed-batch System. En: " Biodegradable Polymers and Plastics ".
 M. Vert. (ed.).Royal Society of Chemistry. Great Britain. pp.229-233.**

- Bruce, A. R., Langlade, V., Carreau, P.J. and J. A. Ramsay. 1993. Biodegradability and Mechanical Properties of Poly-(β -Hydroxybutyrate-Co- β -Hydroxyvalerate)-Starch Blends. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: (4) 1242-1246.**
- Censos Económicos. 1994. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. INEGI. pp. 62-179.**
- Cole, M.A. y K.K. Leonas. 1990. Behavior of starch-containing yard waste collection bags in a field-scale composting environment. En: " Corn Utilization Conference III Proceeding ". pp. 1-6.**
- Corti, A., Vallini, G., Pera, A., Ciono, F., Solaro, R. y E. Chiellini. 1991. Composting microbial ecosystem for testing the biodegradability of starch-filled polyethylene films. En:" Biodegradable Polymers and Plastics ". M. Vert (ed.). Royal Society of Chemistry. Great Britain. pp. 245-248.**
- Chinnaswamy, R., Hanna, M.A. y H. F. Zobel. 1989. Microstructural, physicochemical and macromolecular changes in extrusion-cooked and retrograded corn starch. *Cer. Foods Word.* 34: 415-422.**
- Deunenberg, R.J., Bothast, R.J. y T.P. Abbot. 1978. A new biodegradable plastic made from starch graft Poly(methyl acrylate) Copolymer. *Journal of Applied Polymer Science.* 22: 459-465.**
- Fanta, G.F., Swanson, C.L. y R.L. Shogren. 1992. Starch-poly(ethylene-co. acrylic acid) composite films. Effect of processing conditions on morphology and properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 44: 2037-2042.**

- Fenton, D., Davis, B., Rotgers, C. y D.E. Eveleigh. 1978. Enzimatic hydrolysis of chitosan. En: "Muzzarelli and Pariser ". pp. 525-530.**
- Fogarty, W.M. y O.P. Ward. 1972. Pectic substances and pectinolytic enzymes. Proces Biochemistry. 7: (8) 7-17.**
- Glasser, W.G., Rials, T.G., Kelly, S.L. y T.C. Ward. 1989. Engineered lignin-containing material with multiphase morphology. TAPPI proceedings: wood and pulping chemistry, Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Norcross, Ga. pp. 35-38**
- Gordon, S.H., Imam S.H. y R.V. Greene. 1996. Starch-Based Plastic (Measurement of Biodegradability). En: Polymeric Materials Encyclopedia. Joseph C. Salamone (ed). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 10: 7885-7892**
- Gould, M. J., S.H. Gordon, L.B. Dexter y C.L. Swanson. 1990. Cap. 7: Biodegradation of Starch-Containing Plastics. En: Agricultural and Synthetic Polymers: Biodegradability and Utilization. ACS Symposium Series No. 433. J. Eduard Glass and Graham Seift (eds). pp.65-75.**
- Greizersteins, H.B., J.A. Syracuse y P.J. Kostyniak. 1993. Degradation of starch modified polyethylene bags in a compost field study. Polymer Degradation and stability. 39: 251-259.**
- Holmes, P.A., Collins, S.H. y F. Wright, 1984. U.S. Pat. 4,477,654.**
- Hrabak, O. 1991. PHB-Part of a New Waste Management System. En: "Biodegradable Polymers and Plastics". M. Vert. (ed.). Royal Society of Chemistry. Great Britain. pp. 255-258.**

- Huang, S.-J.** 1995. Polymer waste management-biodegradation, incineration, and recycling. *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.* 32: 593-597.
- Holmes, P. A.** 1988. Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers. En: *Development in crystalline polymers*. D.C. Bassett (ed.). Elsevier, London. pp. 1-65.
- Huang, J.-CH, Shetty, A.S. y M.-S Wang.** 1990. Biodegradable plastics: A review. *Advances in Polymer Technology.* 10: (1) 23-30.
- Iannotti, E., Fair, N., Tempesta, M., Neibiling, H. Hsieh, F.H., y R. Mueller.** 1990. Environmental degradation of conventional and starch-based plastics with and without pro-oxidant addition. En: *Corn Utilization Conference III Proceeding*. National Corn Growers Association, (eds). St. Louis, MO. pp. 1-4.
- Imam, H.S. y J.M. Gould.** 1990. Adhesion of an amylolytic *Arthrobacter* sp. to starch-containing plastic films *Appl. Environ. Microbiol.* 56: (4) 872-876.
- Imam, H.S., Gould, J.M., Gordon, S.H., Kinney, M.P., Ramsey, A.M. y T.R. Tosteson.** 1992. Fate of starch-containing plastic films exposed in aquatic habitats. *Cur. Microbiol.* 25: 1-8.
- Imam, S.H., S.H. Gordon, A.R. Thompson, R.E. Harry-O'kuru y R.V. Greene.** 1993. The use of CP/MAS ¹³C-NMR for evaluating starch degradation in injection molded starch-plastic composites. *Biotechnology Techniques.* 7: (11) 791-794.
- Imam, S.H., S.H. Gordon, A. Burgess-Cassler y R.V. Greene.** 1995. Accessibility of starch to enzymatic degradation in injection-molded starch-plastic composites. *J. Environ. Polym. Degrad.* 3: (2) 107-113.

- Imam, S.H., Gordon, S.H., Greene, R.V. y K.A. Niño. 1996. Starch Biodegradation (In Starch-Plastic Blends). En: Polymeric Materials Encyclopedia. Joseph C. Salamone.(ed) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 10: 7892-7901**
- Johnson, K.E., Pometto III, A.L. y Z.L. Nikolov. 1993. Degradation of degradable starch- polyethylene plastic in a compost environment. Appl. Environ. Microbiol 59: (4) 1155- 1161.**
- Knorr, D. 1991. Recovery and Utilization of Chitin and Chitosan in Food Processing Waste Management. Food Technology. pp.114-122.**
- Koch, H. y H. Röper. 1988. New industrial products from starch. Starch/Stärke. 40: (4) 21-131.**
- Kumagai, Y., Kanosawa, Y., y Y. Doi. 1992. Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) films. Makromol. Chem. 193: 53-57.**
- Lee, B., Pemetto III, A.L., Fratzke, A. y T.B. Bailey Jr. 1991. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. Appl. Environ. Microbiol. 57: (3) 678-685.**
- Leonas, K.K. y R.W. Gordon. 1993. An accelerate laboratory study evaluating the desintegration rates of plastic films in simulated aquatic environments. J. Environ. Polym. Degr. 1: 45-51.**
- Maddever, W.J. y P.D. Campbell. 1990. Current status of starch based degradable plastics. En: " Corn Utilization Conference III Proceedings ". National Corn Growers Association, (eds). St. Louis, MO. pp. 1-23.**

- Martínez, M. y T. Dieck. 1994. Transformación de pañales desechables en termoplásticos para la manufactura de recipientes plásticos. En la Investigación. pp.29-30.**
- Mayer, J.M., Wiley, B., Henderson K. y D. Kaplan. 1989. Physical Properties of Films Prodedced from the Biopolymers Pullulan and Quitosan. U.S. Army Natick Research, Development and Engineering Center, Natick, MA. pp. 71**
- Mayer, J.M., Greenberger, M., Ball, D.H. y D.L. Kaplan. 1990. Polisaccharides, Modified Polysaccharide Blends for Biodegradable Materials. En: Polymeric Materials Science and Engineering. American Chemical Society. pp. 63: 732-735.**
- Mayer, J.M. y D.L. Kaplan. 1994. Biodegradable Materials: Balancing Degradability and Performance. Trip, 2: (7) 227-235.**
- McCarthy Robert A.1989 . Chitin. En: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. Vol 3 Cellular Materials to Composites. John Wiley and Sons. (eds.) New York. pp. 430- 440.**
- McCarthy, L. 1993. Biodegradables blossom in to field of dreams for packagers. Plastic World. pp. 22-27.**
- Meister, J.J. 1991. Soluble or crosslinked graft copolymers of lignin, acrylamide, and hydroxymethacrylate. U.S. patent 5,037,931.**
- Mergaert, J., Wouters, A., Swings, J. y K. Kersters. 1991 . Microbial Flora Involved in the Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates. En: "Biodegradable Polymers and Plastics". M. Vert. (ed.). Royal Society of Chemistry. Great Britain. pp. 267-270.**

- Milstein, O., Gersonde, R., Huttermann, A., Chen M. y J.J. Meister. 1992. Fungal Biodegradation of Lignopolystyrene Graft Copolymers. *App. and Environ. Microbiol.* 58: (19) 3225-3232.**
- Monroy, J., Moreno, R., Pedroza, R., Pietrini, F., Aguilar, E. y M. Castrezana. 1990. Obtención de pectinas. El aprovechamiento de subproductos agroindustriales. *CONACYT.* 12: (168) 37-39.**
- Murray, A.E. y D. Hattis. 1978. Approaches to a practical assessment of supply and demand for chitin products in the United States. En: "Muzzarelli and Pariser ". pp. 30-38.**
- Murphy, C.A., Cameron, J.A., Huang, S.J. y R. T. Vinopal. 1996. Fusarium polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: (2) 456-460.**
- Narayan, R. 1991. Cap. 1. Development of Standars for Degradable Plastics by ASTM Subcommittee D-20.96 on Environmentally Degradable Plastics. En: *Biodegradable Polymers and Plastics. ACS Symposium Series No. 575, American Chemical Society.* pp. 176-187**
- Otey, F.H. y A.M. Mark. 1976. Degradable starch based agricultural mulch film. U.S. Patent. 3,949,145.**
- Otey, F.H., Westhoff, R.P. y C.R. Russell. 1976. Starch graft copolymers-degradable fillers for poly(vinyl choride) plastics. *I & EC Product research & Development.* 15: 139.**

- Otey, F.H., Westhoff, R.P. y C.R. Russell. 1977. Biodegradable films from starch and ethylene-acrylic acid copolymer. I& EC Produc Research & Development. 16: 305.**
- Otey F.H. y R.P. Westhoff. 1979. Biodegradable film compositions prepared from starch and copolymers of ethylene and acrylic acid. U.S. Patent . 4,133,184.**
- Otey F.H. y W.M. Doane. 1981. Starch: A raw material with important potential. J. Commerce. 347: 4a-6a.**
- Otey F.H. y R.P. Westhoff. 1982. Biodegradable starch-based blown films. U.S. Patent. 4,337,181.**
- Otey F.H. y R.P. Westhoff. 1984a. Starch-based films. Preliminary diffusion evaluation. I & EC Product research and Development. pp. 284-287.**
- Otey F.H. y R.P. Westhoff. 1984b. Starch-based semipermeable films. U.S. Patent. 4,454,268.**
- Otey F.H. y W.M. Doane. 1987. Starch-based degradable plastic film. Proceedings of symposium on degradable plastics. The Society of the Plastics Industry., Inc., Washington, D.C. pp. 39-40.**
- Otey, H. F., Westhoff, R.P. y M.D. William. 1987. Starch-based Blown Films. Ind. Eng. Chem. Res. 26: (8) 1659-1663.**
- Pennisi, E. 1993. Chitin craze. Science News. 144: 72-74.**
- Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K. y C. Somerville. 1992. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. Science. 256: 520-523.**

- Poirier, Y., Nawarath C. y C. Somerville. 1995. Production of Polyhydroxyalkanoates a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. Biotechnology. 13: 142-150.**
- Potts, J.E. 1978. Cap. 14. En: Aspects of Degradation and Stabilization of Polymers. H.H.G. Jellinek. (de). Elsevier. Amsterdam. pp. 115-125.**
- Rizzo E, Rangel N. y L. Villarreal. 1995. Cap. 5.14. La contaminación del ecosistema. En: Atlas de Monterrey. Ed. Gobierno del Estado de Nuevo León, Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Estudios Urbanos de Nuevo León, El Colegio de México. (ed) pp.303-308.**
- Rutherford, F. A. y W. A. Dunson. 1984. The permeability of chitin films to water and solutes. En: Chitin, Chitosan, and related enzymes. Ed. Academic Press, Inc. pp. 135-143.**
- Shogren, R.L. 1992. Effect of moisture content on the melting and subsequent physical aging of cornstarch. Carbohydr. Polym. 19: 83-90.**
- Stephen Nicol. 1991. Litter after death for empty shells. New Scientist. 9 February. pp. 46-48.**
- Swanson, C.L., Westhoff, R.P., Doane, W.M. y F.H. Otey. 1987. Starch-based blown films or agricultural mulch. Polymer Preprint. 28: (2) 105-106.**
- Swanson, C.L., Fanta, G.F. y S.H. Imam. 1993. Preparation, Physical Properties, and Biodegradability (A Review of Recent USDA Research). J. Environ. Polym. Degrad. 1: (2) 155-166.**
- T. Tsugita, 1989. Chitin/Chitosan and Their Applications. En: Advances in Fisheries**

Technology and Biotechnology for Increased Profitability. Michael N. Voigt and J. Richard Botta. (eds). Technomic, Publishing Company, Inc. Lancaster, Pennsylvania, U.S.A. 287-04.

Uchida, Y., Kurusu, Y. y H, Yukawa. 1991. Estimation method of biodegradability of polymers in the environment by DNA probe method. En: " Biodegradable Polymers and Plastics". M. Vert (ed.). Royal Society of Chemistry. Great Britain. pp. 279-282.

U.S. Environmental Protection Agency. 1988. The Solid waste dilemma: An Agenda for Action, Draft Report of Municipal Solid Waste Task Force. EPA 530 SW 88 052.

Van der Zee, M., Tounois, H., Timemermans y R.O.J. Jonghoom. 1991. Biodegradable material: Thermoplastic starch. En: " Biodegradable Polymers and Plastics ". M. Vert. (ed.). Royal Society of Chemistry. Great Britain. pp.283-284.

Westhoff, R.P., Kwolek, W.F. y F.H. Otey. 1979. Starch-polyvinyl alcohol films effect of varius plasticizers. Starch/Stärke. 31 Nr. 5,S.pp. 163-165.

Wirka, J. 1988. Wrapped in Plastics: The environmental case for reducing Plastics Packaging. Environmental Action Foundation. Washington, D.C.

Wiley, B.J. Ball, D.H., Arcidiacono, Sousa, S., Mayer, J.M., and D.L. Kaplan. 1993. Control of Molecular Weight Distribution of the Biopolymer Pullman by *Aureobasidium pullulans*. Journal of Environmental Polymer Degradation. 1: (1) 3-9.

Witteoff, H.A. y B.G. Reuben. 1985. Como se obtienen los polimeros. Cap. 4. En: " Productos Químicos Orgánicos Industriales ". Vol. 1: Materias Primas y Fabricación. LIMUSA, Mex. D.F. pp. 183-240.

- Wittcoff, H.A. y B.G. Reuben. 1987. Plásticos. Cap. 2. En: " Productos Químicos Orgánicos Industriales ". Vol 2: Tecnología, Formulaciones y Usos. LIMUSA, Mex. D.F. pp.63-127.
- Yagi, K., Miyawaky, Y., Kayashita, A., Kondo, M., Kitano, Y., Murakami, Y., Maeda, Y., Umeda, F., Miura, Y., Kawase M. y T. Mizoguchi. 1996. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxyalkanoic Acid) Copolymer from CO² in *Pseudomonas acidophila* through introduction of the DNA fragment responsible for chemolithoautotrophic growth of *Alcaligenes hydrogenophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1004-1007.
- Yamane, T., Chen X. y S. Ueda. 1996. Growth-associated production of Poly(3-Hydroxyvalerate) from *n*-pentanol by a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. Appl. Environm. Microbiol. 62: (2) 380-384.

APENDICE

A.- Modelos Tridimensionales Teóricos de las estructuras químicas de los polímeros sintéticos, PEBD y EAA (derecha), así como de los polisacáridos, almidón, quitina y pectina utilizados en la elaboración de las diferentes membranas (izquierda).

B.- Modelo Tridimensional Teórico de la estructura química de las membranas elaboradas a base de almidón y quitina.

C.- Modelo Tridimensional Teórico de la estructura química de las membranas elaboradas a base de almidón y pectina.

D.- Modelo Tridimensional Teórico mostrando la estructura química que quedaría después de ser degradado el polisacárido en una membrana biodegradable.

