Región de Murcia

Unión Europea
Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

info REGIÓN DE MURCIA

cetec
centro tecnológico
del calzado y del plástico

Centro tecnológico del calzado y del plástico.

Encapsulación de aditivos para biodegradación de plásticos

Índice

1. **Resumen por objetivos** pág. 1

2. **Informe por objetivos**

Objetivo 1: Investigación y obtención de nuevas formulaciones De ácido poliláctico con mayor capacidad de degradación con encapsulación de enzimas pág. 2

1.1 Investigación y obtención de nuevos aditivos al ácido poliláctico pág. 2

1.1.1 Almidón pág. 4

1.1.2 Quitosano pág. 5

1.1.3 Polietilenglicol pág. 9

1.1.4 Sulfato y carbonato de calcio. pág. 11

1.2 Investigación, obtención e inclusión de nuevos aditivos con enzima proteinasa K que permitan un mayor grado de biodegradabilidad al PLA pág. 13

1.2.1 Obtención de proteinasa K adsorbida sobre diferentes aditivos pág. 19

A. Obtención de proteinasa K absorbida sobre almidón pág. 19

B. Obtención de proteinasa K absorbida sobre compuestos con poder de fertilización pág. 27

1.2.2 Obtención de microencapsulados de proteinasa K pág. 32

A. Obtención de microcápsulas de alginato de sodio pág. 35

B. Obtención de microcápsulas de alginato de calcio pág. 39

1.2.3 Inmovilización de proteinasa K pág. 48

A. Inmovilización de proteinasa K directamente sobre PLA pág. 48

B. Inmovilización de proteinasa K sobre cinamato pág. 51

Objetivo 2: Investigación y obtención de nuevas formulaciones de polibutilen-adipato-co-tereftalato con mayor capacidad de degradación con encapsulación de enzimas pág. 55

2.1 Modificación e incorporación de nuevos aditivos al PBAT para aumentar su capacidad de degradación. pág. 58

2.1.1 Ángulos de contacto pág. 58

2.1.2 Espesores de capa pág. 65

2.1.3 Sales Inorgánicas pág. 70

2.1.4 Sorbitol pág. 75

2.2 Investigación y obtención de nuevas formulaciones de PBAT y PLA con encapsulación de las enzimas proteinasa K, α-amilasa y lipasa B pág. 77

2.2.1 Investigación de la actividad de α-amilasa pág. 77

2.2.2 Investigación y encapsulación de proteinasa K, lipasa B y α-amilasa sobre cinamatos e incorporación al PBAT pág. 84

2.2.3 Investigación de la biodegradación de films de PBAT-PLA en disoluciones de proteinasa K, a-amilasa y lipasa B pág. 87

3 ***Conclusiones*** pág. x

1. RESUMEN POR OBJETIVOS

Objetivo primero: **Investigación y obtención de nuevas formulaciones De ácido poliláctico con mayor capacidad de degradación con encapsulación de enzimas**

Objetivo segundo: **Investigación y obtención de nuevas formulaciones de polibutilen-adipato-co-tereftalato con mayor capacidad de degradación con encapsulación de enzimas**

2. INFORME POR OBJETIVOS

Objetivo 1. Investigación y obtención de nuevas formulaciones de ácido poliláctico con mayor capacidad de degradación con encapsulación de enzimas

Objetivo 1.1: Investigación e inclusión de nuevos aditivos al ácido poliláctico.

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero termoplástico degradable que presenta excelentes propiedades mecánicas lo que ha permitido un crecimiento exponencial de su fabricación industrial en los últimos años. En los últimos años, el uso de polímeros degradables como el PLA ha sido ampliamente estudiado en la industria médica y farmacéutica, textil y la del empaquetado.

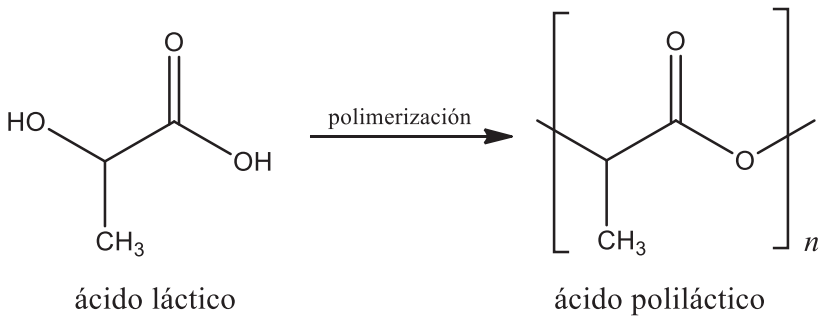


Figura 1. Estructuras químicas del ácido poliláctico y su monómero precursor el ácido láctico.

El PLA es capaz de sufrir un proceso de hidrólisis del grupo éster, fragmentando las largas cadenas en unidades más pequeñas hasta oligómeros y monómeros. A su vez, la formación de grupos carboxílicos como consecuencia del proceso de degradación provoca un efecto auto catalítico del ácido poliláctico.

Son algunos los factores que influyen en el proceso de biodegradación de cualquier tipo de polímero y en especial del PLA:

- Peso molecular: se ha observado que polímeros de PLA con mayor peso molecular tardan más tiempo en degradarse que los que poseen menor peso molecular.

- Factores relacionados a su estructura ordenada: temperatura de transición vítrea (T_g) y temperatura de fusión (T_m).
- Factores relacionados a la superficie: área de superficie, hidrofilia y propiedades hidrofóbicas)[1].
- Cristalinadad: al igual que con el peso molecular, cuanto mayor sea el grado de cristalinidad del PLA, mayor será el tiempo que tardará en degradarse.

Todos estos factores se deberán tener en cuenta para poder diseñar un proceso que permita una mayor degradación del PLA.

En este apartado se incluyen los aditivos objeto de estudio a incluir en el poliláctico con el fin de obtener un aumento significativo en la velocidad de degradación, evitando una pérdida importante de las propiedades mecánicas del mismo.

[1] Nishida, H.; Tokiwa, Y. *J Appl Polym Sci*, **1992**, *46*, 1467.

1.1.1 Almidón

El almidón es un polisacárido ampliamente utilizado como aditivo de carga en plásticos debido a su bajo coste, elevada disponibilidad y su procesabilidad en técnicas convencionales para el procesado de plásticos lo que permite reducir los costos de producción.

La inclusión de almidón como aditivo de carga al PLA genera la formación de un nuevo polímero con mayor capacidad de biodegradación[2] ya que se favorece un incremento de la absorción de agua en el plástico debido a la presencia del almidón[3] y, por consiguiente, se facilita su hidrólisis por la acción de microorganismos, degradando el poliláctico hasta la obtención de oligómeros y monómeros de ácido láctico.

Sin embargo, la adición de una concentración superior al 20% de almidón provoca un empeoro de las propiedades mecánicas del PLA (como la fuerza de tensión o el coeficiente de elongación) debido a las bajas atracciones interfaciales entre ambos componentes[4].

Figura 2. Imagen a microscopio de 200 aumentos de un film con un 7% de almidón.

Por lo tanto, se incluirá un porcentaje en peso de almidón en todos los films creados, que variará entre un 5 y un 9%.

---

[2] Wang, H.; Sun, X.Z.; Seib, P. *Journal of Applied Polymer Science*, **2001**, *82*, 1761.

[3] Ke, T.Y.; Sun, X.Z. *Cereal Chem*, **2000**, *77*, 761.

[4] Yew, G.H.; Yosuf, A.M.; Ishak, Z.A.; Ishiaku, U.S. *Polymer degradation and stability,* **2005**, *90*, 488.

1.1.2 Quitosano

El quitosano (QN) es un aminopolisacárido que se obtiene a nivel industrial a partir de la quitina. Es un polisacárido versátil debido a la presencia del grupo funcional amino, lo que permite su modificación para conseguir diferentes propiedades como la solubilidad, ya que es soluble en disoluciones ligeramente ácidas.

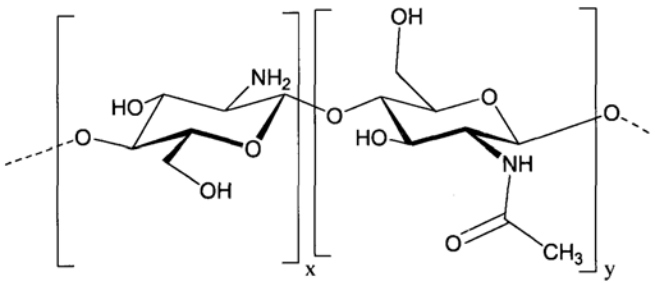


Figura 3. Estructura química del quitosano.

El quitosano es actualmente utilizado como aditivo al PLA debido a su compatibilidad y biodegradabilidad, actuando como un perfecto aditivo de carga. Además, al ser un compuesto altamente hidrofílico permite una mayor absorción de agua y acelera la degradación.

Otro dato importante a conocer sobre el quitosano es que suprime la cristalinidad del PLA, aumentando la proporción de zonas amorfas que son más susceptibles a la degradación.

Estudios realizados por autores venezolanos[5] revelaron que la adición de un porcentaje de QN al PLA favorece su biodegradación en presencia de microorganismos a lo largo del tiempo. Estos hechos se comprobaron produciendo dos composiciones con diferentes porcentajes de PLA-QN, 80-20 y 60-40, que posteriormente se dejarían en contacto con el suelo. Para poder verificar si aumentaba el proceso de biodegradación realizaron medidas de diferencia de peso, incorporando el parámetro "peso de retención" como un porcentaje:

[5] Rodríguez, A.; Matos, M.; Rosales, C. Tesis Doctoral *"Estudio de la degradación de compuestos de poli(ácido láctico) con sulfato de calcio y quitosano".* Universidad Simón de Bolívar, Venezuela, **2009.**

$$\%\,\mathrm{Re}tención = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100$$

Ecuación 1. Ecuación para el porcentaje de pérdida de peso

Donde:

P_0 = peso inicial de la muestra

P_f = peso final de la muestra

En la gráfica siguiente se muestran las variaciones del porcentaje de peso medidas para el PLA y los dos tipos de PLA-QN:

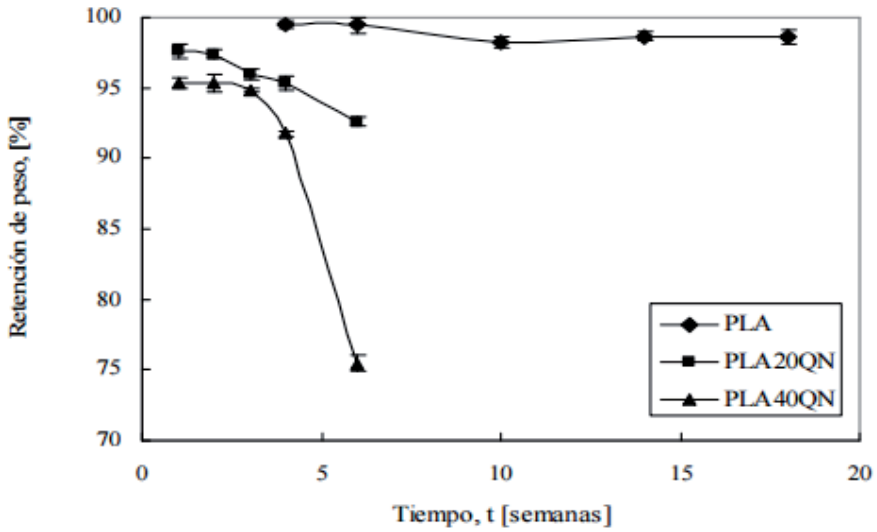


Figura 4. Variación en peso de las muestras de PLA, PLA20QN y PLA40QN.

En el grafico puede observarse una disminución del peso a medida que transcurre la degradación en compostaje. La pérdida es más rápida para el PLA que posee QN, consiguiéndose a las 6 semanas una pérdida en peso del 8% y del 24% para el PLA20QN y PLA40QN, respectivamente. Sin embargo, para el PLA sin la presencia del polisacárido se observa únicamente un 2% de pérdida de peso a las 6 semanas.

En los ensayos preliminares de QN se adicionó un 1% de este compuesto al PLA para facilitar, aunque mínimamente, la biodegradación y para generar la formación de lactatos de quitosano como consecuencia de la formación de oligómeros y monómeros ácidos una vez comience dicho proceso. Sin embargo, la adición del QN se produjo mediante una dispersión del mismo en el PLA, generando un film granuloso y transparente. Este proceso se mejorará con posterioridad al incluir otros aditivos.

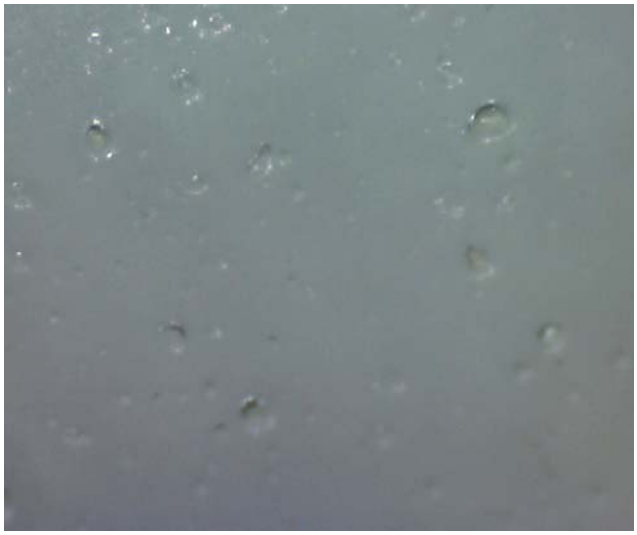


Figura 5. Imagen a microscopía de 200 aumentos del PLA con un 1% de QN.

Otro ensayo fue aumentar la concentración de QN hasta un 5% en el PLA y añadir un 5% de PEG para facilitar la dispersión del QN, aunque los resultados no fueron los esperados ya que se obtuvo un film de textura muy granulosa y de color amarillo.

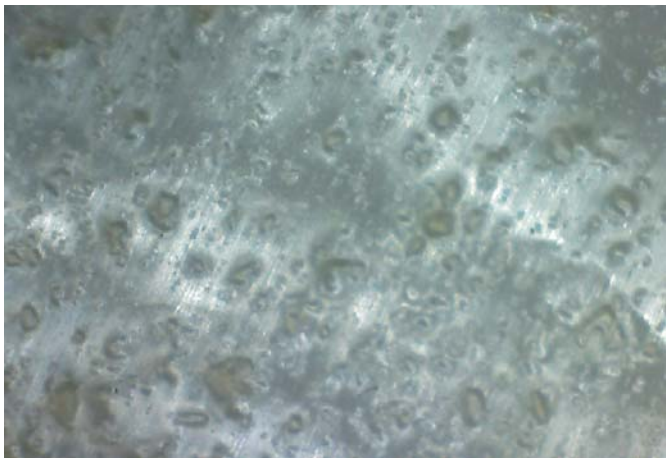


Figura 6. Imagen a microscopía de 200 aumentos del PLA con un 5% de QN y un 5% de PEG.

La difícil inclusión del quitosano en el PLA es debido al elevado tamaño de partícula que posee lo que ocasiona una textura granulosa. Con el objetivo de reducir el tamaño de partícula se realizó un ensayo que consistía en adicionar gota a gota una disolución de NaOH a pH 9 sobre quitosano en agua (2.8% en masa) acidificada con ácido acético. Se pudo obtener un tamaño de partícula menor que el comercial y así lo demuestra las imágenes recogidas a microscopía de 600 aumentos.

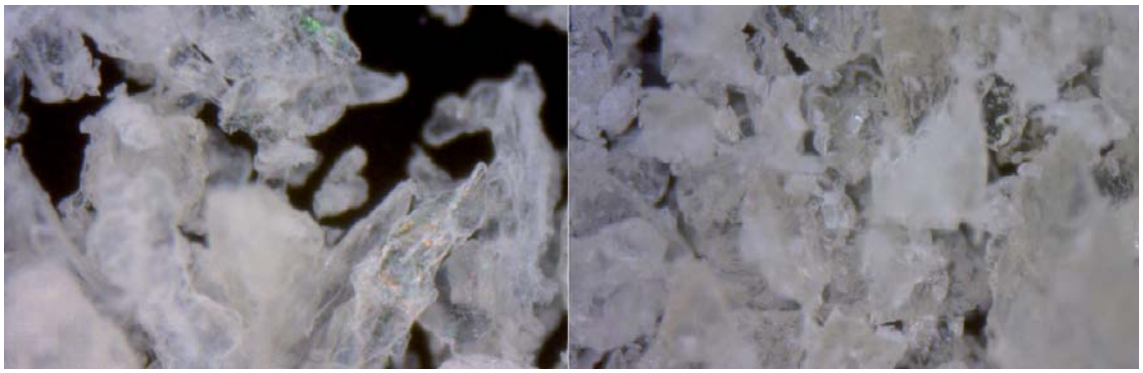


Figura 7.Imagenes a microscopio de 600 aumentos de quitosano comercial (izquierda) y precipitado (derecha).

Por lo tanto, a pesar de tratarse de un aditivo que favorece la degradación del PLA no se va a utilizar en el desarrollo de este proyecto debido a las bajas propiedades mecánicas que presenta el PLA resultante.

1.1.3 Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es un poliéter ampliamente utilizado en la industria, sobre todo como disolvente en reacciones. Generalmente, su nombre aparece asociado a un número que indica la masa del polímero u oligómero.

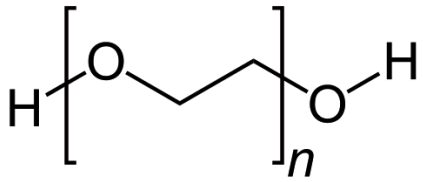


Figura 8. Estructura química del polietilenglicol.

Los estudios del PEG como aditivo al PLA revelaron que se producía una mejora en algunas de las propiedades de éste, como es el caso de la fragilidad, y se producía un aumento de sus aplicaciones[6].

El grupo de investigación estadounidense dirigido por el profesor McCarthy[7] demostraron que la adición de PEG (con un peso molecular de 20000 g/mol) al PLA provocaba un incremento en la velocidad de degradación de éste como consecuencia de un aumento de la absorbancia de agua por parte del PEG. El estudio se realizó con mezclas que poseían diferentes porcentajes de PLA-PEG, observándose que para mezclas que poseían un 30% o más de PEG, se producía la degradación del PLA y la disolución del PEG, lo que provocaba un cambio en las propiedades mecánicas del PLA.

Los mejores resultados se obtuvieron con un porcentaje de PLA-PEG de 70-30, tal y como demuestra el siguiente gráfico:

[6] Paul, M.A.; Alexandre, M.; Degrée, P.; Henrist, C.; Rulmont, A.; Dubois, P. *Polymer*, **2003**, *44*, 443.

[7] Sheth, M.; Kumar, A.R.; Davé, V.; Gross, A.; McCarthy, S.P. *Journal of Applied Polymer Science*, **1997**, *66*, 1495.

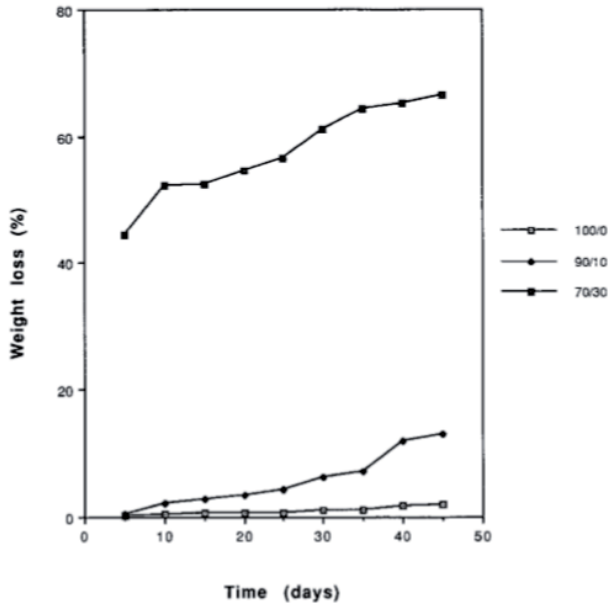


Figura 9. Gráfico que representa la pérdida en peso frente al tiempo para distintas mezclas de PLA-PEG.

Para el desarrollo de este objetivo se incorporó un porcentaje de PEG (inicialmente un 5% de PEG 4000 y posteriormente una mezcla formada por un 2% de PEG 4000 y un 3% de PEG 10000) al PLA con el objetivo principal de generar un film con mayor capacidad de retención de agua y facilitar así su hidrólisis. El film obtenido es parcialmente transparente y presenta buenas propiedades mecánicas. No se aumentó el porcentaje de PEG debido a la pérdida de propiedades mecánicas.

Figura 10. Film BIOM F4 que posee un 5% de PEG 4000.

1.1.4 Sulfato y carbonato de calcio.

El sulfato de calcio (comúnmente denominado como yeso) es un subproducto resultante de la fermentación de glucosa hasta ácido polilático mediante cultivos de microorganismos. Es por ello que su uso como aditivo de carga en el PLA es ampliamente utilizado.

Muriaru y su equipo de investigación[8] demostraron que existe una buena adhesión interfacial entre la matriz del PLA y el sulfato de calcio. A partir de estos estudios se observó que el sulfato de calcio era capaz de catalizar la degradación del PLA, tal y como se muestra en el mecanismo de la imagen siguiente.

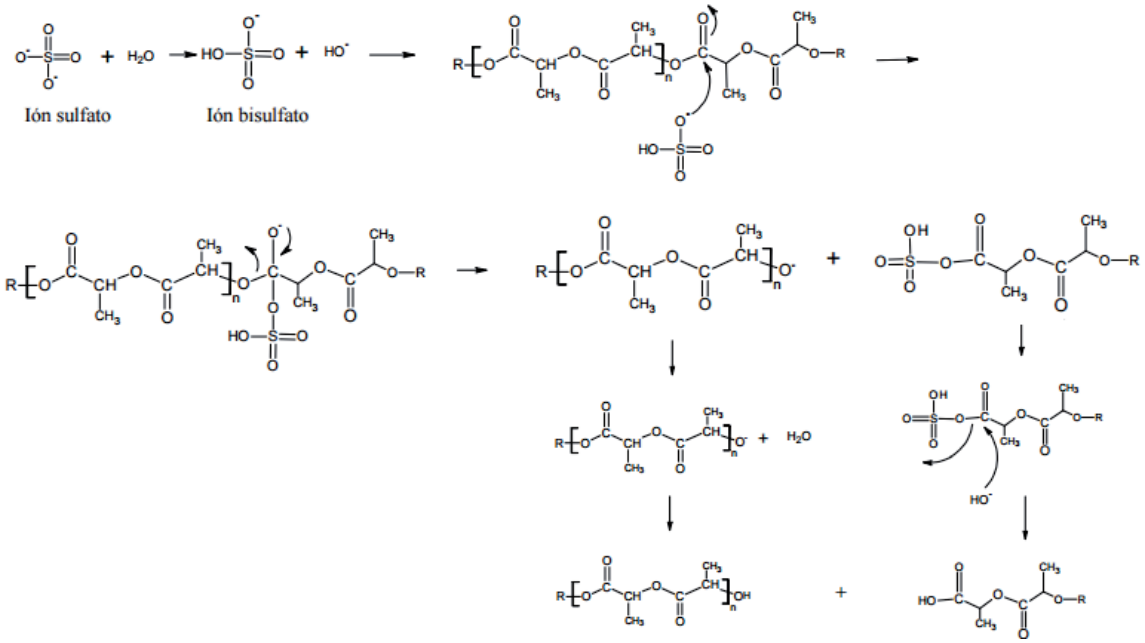


Figura 11. Mecanismo propuesto para la degradación de PLA catalizada por $CaSO_4$.

El mecanismo propuesto comienza con la formación del ión bisulfato a partir del anión sulfato y agua. Este bisulfato actúa como un agente nucleófilo atacando al carbono del grupo carbonilo (que se trata de un carbono electrófilo). Este ataque provoca la ruptura del enlace simple C-O y por lo consiguiente la ruptura de la cadena. Posteriormente, se produciría el ataque al agua del alcóxido generado y la liberación de iones hidroxilos que generan la salida del bisulfato en la otra cadena.

[8] Pluta, M.; Muriaru, M.; Da Silva, A.F.; Alexandre, M.; Galeski, A.; Dubois, P. *Journal of Applied Polymer Science*, **2007**, *45*, 2770.

Sin embargo, a pesar de existir una buena adhesión interfacial entre ambos componentes, si se observa una disminución en las propiedades mecánicas del polímero resultante debido a la presencia de los iones sulfato.

A la luz de estos hechos se decidió utilizar como aditivo el carbonato de calcio ($CaCO_3$) ya que, además de ser un aditivo de carga ampliamente utilizado en polímeros por su bajo coste, su hidrólisis produce un anión hidrogenocarbonato cuyo mecanismo sería igual que el hidrogenosulfato con la única diferencia que reaccionaría finalmente con agua formando ácido carbónico que debido a su baja estabilidad se descompone en agua y CO_2, favoreciéndose la hidrólisis al desplazar el equilibrio.

Un ensayo preliminar fue incluir un porcentaje del 5% de $CaCO_3$ en el PLA y observar si existe una buena compatibilidad entre ambos componentes. Los resultados fueron positivos y todos los films utilizados en esta memoria contienen un 15% de $CaCO_3$ como aditivo, excepto en aquellos casos en los que se mencione lo contrario.

Objetivo 1.2: Investigación, obtención e inclusión de nuevos aditivos con enzima Proteinasa K que permitan un mayor grado de biodegradabilidad al PLA.

CETEC precisa obtener ácido poliláctico que presente un mayor grado de biodegradabilidad al que actualmente comercializa. Hay diferentes enzimas y especies de microorganismos descritas en la bibliografía que pueden degradar el PLA como actinomicetos[9], levaduras[10], bacterias[11] u hongos[12].

En lo referente al uso de enzimas como catalizadores, se ha descrito en la bibliografía la degradación de PLA por acción de lipasas[13] y proteasas[14]. Entre todas estas enzimas destaca una proteasa de tipo serina, la proteinasa K, debido a que presenta la mayor efectividad para la degradación del PLA[15] y por lo tanto será elegida para la consecución de este objetivo.

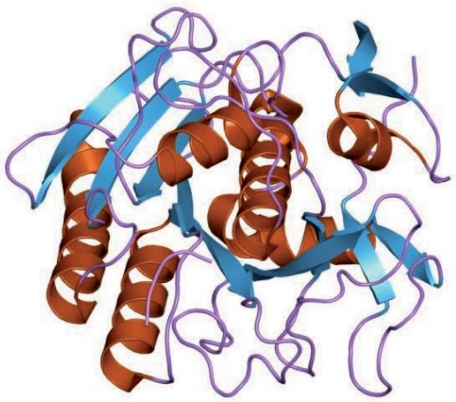


Figura 12. Imagen tridimensional de la proteinasa K.

9 Ikura, Y.; Kudo, T. *J Gen Appl Microbiol*, **1999**, *45*, 247.

10 Jareat, A.; Tokiwa, Y. *Macrobol Biosci*, **2001**, *1*, 136.

11 Uchida, H.; Nakajima-Kambe, T.; Shigeno-Akutsu, Y.; Nomura, N.; Tokiwa, Y.; Nakahara, T. *Microbiol Lett*, **2000**, *189*, 25.

12 Oda, Y.; Asari, H.; Urakawi, T.; Tonomura, K. *Microbiol Lett*, **1995**, *152*, 339.

13 Akutsu-Shigeno, Y.; Teeraphatpornchai, T.; Teamtisong, K.; Kamura, N.; Uchiyama, H.; Nakahara, T.; Nakajima-Kambe, T. *Appl Environ Microbiol*, **2003**, *69*, 2498.

14 Lim, H.A.; Reku, T.; Tokiwa, Y. *Biotechnol Lett*, **2005**, *27*, 459.

15 Williams, D.F. *Engineering in Medicine,* **1981**, *10*, 5.

El centro activo de la enzima se compone de una tríada catalítica muy típica en la familia de las serín-proteasas que se basa en los aminoácidos ácido aspártico (D39), histidina (H69) y serina (S224), que a su vez están espacialmente próximos al bolsillo de oxoaniones, una cavidad que se haya dentro del centro activo constituida por el aminoácido asparagina (N161)[16].

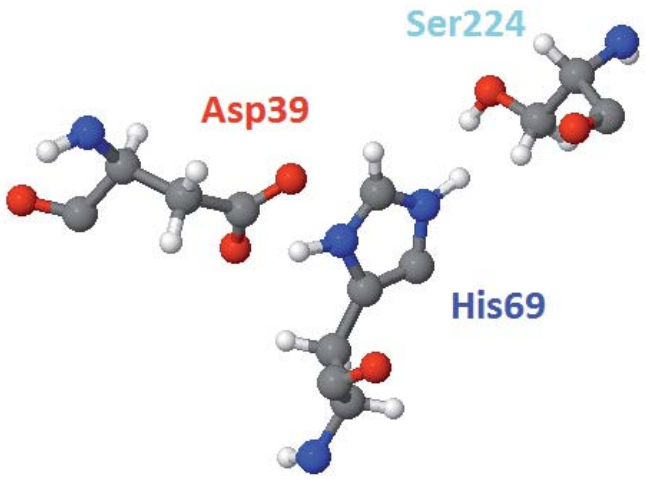


Figura 13. Representación espacial de los 3 aminoácidos que constituyen el centro activo de la enzima.

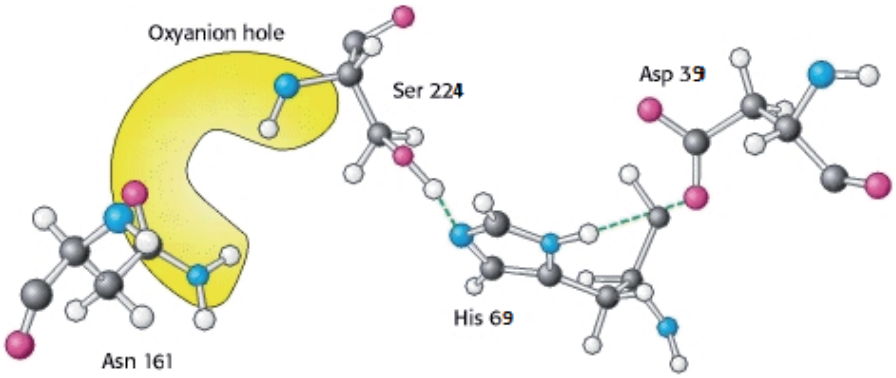
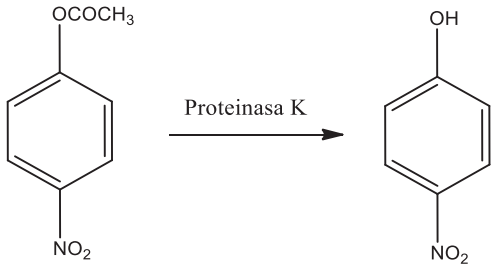


Figura 14. Representación esquemática del centro activo junto al bolsillo de oxianiones, necesario para poder realizar el mecanismo catalítico.

16 Betzel, C.; Pal, G.P.; Saenger, W. *Eur. J. Biochem., 178*, **2011**, 289.

Para caracterizar la actividad enzimática de la proteinasa K, a través de sus parámetros enzimáticos correspondientes (V_M y K_M), se va a llevar a cabo el estudio de medidas de absorbancia descrito en la bibliografía del producto resultante de la ruptura del enlace acetato del compuesto orgánico *p*-nitrofenil acetato (pNA) por la proteinasa K para generar el correspondiente alcohol, *p*-nitrofenol (PNP)[17].



Esquema 1. Reacción de desacetilzación catalizada por la proteinasa K.

En primer lugar es necesario preparar las disoluciones para realizar las medidas:

a) Disolución Tampón: la enzima debe encontrarse en una disolución tampón 20 mM de acetato de *N*,*N*'-etilmorfolina (NEMa), preparada a partir de *N*-etilmorfolina (23 μl) en agua (10 mL) y ajustada a pH=8 con ácido acético.
b) Disolución de la enzima: es necesario preparar una de 20 μg/mL de proteinasa K en 20 mM de la disolución de NEMa a un valor de 7.4 de pH.
c) Disolución del *p*-nitrofenil acetato: se prepara una disolución de partida de pNA 220 mM, en metanol como disolvente y se diluye para obtener una concentración 2.5 mM. Antes de proceder a realizar las medidas es necesario dejar a temperatura ambiente la disolución de pNA entre 3 y 20 horas para que se produzca su total disolución en el metanol.

Se realizaron medidas de absorbancia a una longitud de onda de 425 nm, de la reacción cada 10 segundos como intervalo durante un tiempo máximo de 120 segundos. El coeficiente de extinción de absorción es 18,5 mM^{-1} cm^{-1}.

Se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos de velocidad máxima de la enzima (V_M) y de la constante de velocidad K_M. Para ello, se realizaron medidas de absorbancia a diferentes concentraciones de pNA (desde 0.2 hasta 2.5 mM) y 20 μg/ml de

[17] Stone, A.L.; Jackson, G.S.; Collinge, J.; Wadsworth, J.D.; Clarke, A.R. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 245.

concentración de la enzima. A partir de los datos de absorbancia obtenidos, se puede calcular la velocidad inicial para cada reacción (V_0). En la tabla número X se muestran las concentraciones del sustrato pNA, las medidas de absorbancia obtenidas, la concentración del producto PNP y la velocidad inicial para cada una de las medidas.

Tabla 1. Cálculo de las velocidades iniciales para las diferentes concentraciones de pNA.

[pNA] (mM)	A	[PNP] (µmol)	V_0 (µmoles/min)
0,2	0,022	1,189	0,595
0,5	0,051	2,757	1,378
0,75	0,065	3,514	1,757
1	0,075	4,054	2,027
1,5	0,091	4,919	2,459
2	0,106	5,730	2,865
2,5	0,107	5,784	2,892

Representando las velocidades iniciales (en µmol/min) frente a la concentración de pNA (en mM), obtenemos la siguiente gráfica:

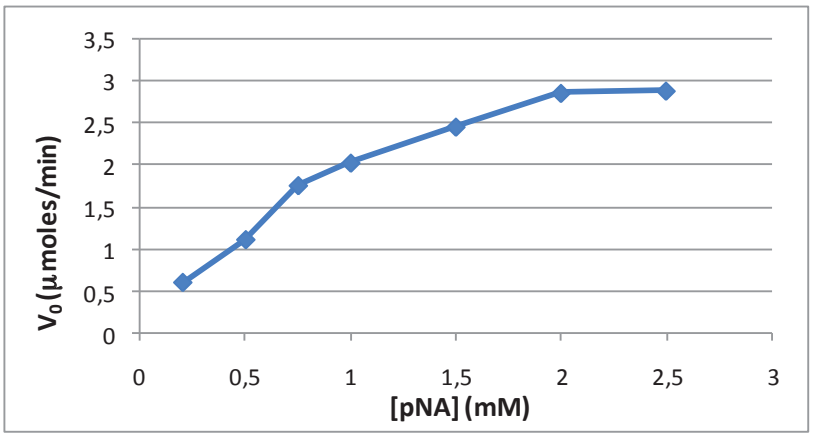


Figura 15. Representación gráfica de las velocidades iniciales frente a la concentración de sustrato.

La ecuación de Michaelis-Menten nos relaciona la velocidad inicial de la reacción con la V_M, la K_M y la concentración de sustrato a través de la siguiente ecuación:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 2. Ecuación de Michaelis-Menten.

Si sobre esta ecuación realizamos unos cambios, la ecuación resultante puede expresarse de la siguiente forma:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Ecuación 3. Ecuación de Michaelis-Menten.

A continuación, calculamos el inverso de la concentración del *p*-nitrofenil acetato y de las velocidades iniciales para cada concentración:

Tabla 2. Inverso de la concentración del sustrato y de las velocidades iniciales.

[1/S] (1/mM)	$1/V_0$ (min/µmol)
5,00	1,68
2,00	0,73
1,33	0,57
1,00	0,49
0,67	0,41
0,50	0,35
0,40	0,35

Por último, representando en el eje de abscisas el inverso de la concentración de pNA y en el de ordenadas el inverso de la velocidad inicial para cada concentración, obtenemos el siguiente gráfico:

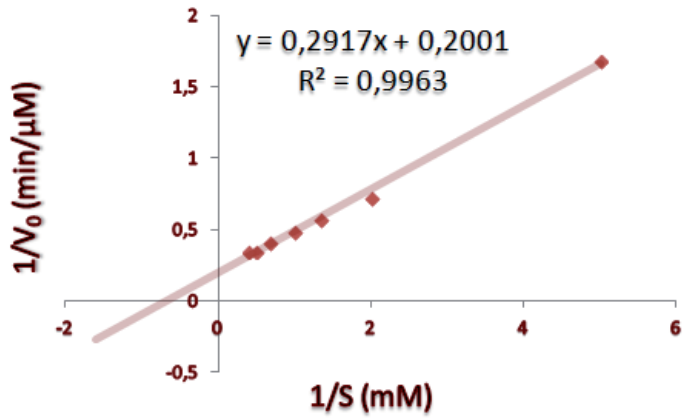


Figura 16. Gráfico del inverso de las velocidades iniciales y de las concentraciones de reactivo.

Tal y como se ha mencionado en la ecuación anterior 3, la ordenada en el origen de la recta se trataría del inverso de la velocidad máxima, por lo que:

$$1/V_{max} = 0.200 \rightarrow V_{max} = 5.0\ \mu mol/min$$

Dividiendo entre el volumen de reacción (3 ml):

$$V_{max} = 5.0/3 = 1.70\ \mu M/min$$

Si igualamos la ecuación de la figura X a cero, es decir, cuando $1/V_0 = 0$, y realizamos operaciones para despejar términos obtenemos que:

$$1/[S_0] = -1/K_M$$

Por lo tanto, si aplicamos estos datos en nuestra recta:

$0.292x + 0.200 = 0 \rightarrow x = -0.200/0.292 = -0.685$

Como $x = -1/K_M \rightarrow -1/K_M = -0.685 \rightarrow$ $K_M = 1.46$ mM

1.2.1 Obtención de proteinasa K encapsulada sobre diferentes aditivos.

Este objetivo consta a su vez de dos subobjetivos:

A. Obtención de proteinasa K encapsulada sobre almidón.

Para la obtención de proteinasa K encapsulada sobre almidón se preparó una disolución al 2% en peso de almidón soluble en agua que se dejó en agitación durante 1 hora. Tras finalizar este tiempo, se adicionó bajo baño de hielo una disolución de la enzima tal que la concentración final de la mezcla fuera 2 μM. El resultante se congeló y se liofilizó.

Para el proceso de liofilización se utilizó un liofilizador Testlar Cryodos.

Figura 17. Liofilizador Testlar Cryodos utilizado para los procesos de liofilización de este trabajo.

El producto obtenido se trata de un polvo de color blanco que pudo observarse mediante un microscopio de mano PCE-MM200.

Figura 18. Imagen del almidón liofilizado que contiene a la enzima a microscopio de 200 aumentos.

Figura 19. Microscopio de 200 aumentos PCE-MM200.

Una vez obtenido el almidón con la enzima era necesario comprobar si poseía actividad enzimática. Para ello se realizó un ensayo con 50 mg de almidón y una concentración de sustrato 10 mM, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3. Medidas de absorbancia obtenidas con almidón y una concentración de la enzima 2.1 µM liofilizadas.

Almidón		[Proteinasa K]	
50 mg		2 µMolar	
t (s)	A	t (s)	A
0	0	60	0,089
10	0,016	70	0,101
20	0,025	80	0,109
30	0,039	90	0,113
40	0,053	100	0,114
50	0.068	110	0.115

Obsérvese que no se incluye el valor de absorbancia a los 120 segundos debido a que era inferior a 0.115 y por lo tanto se puede despreciar, ya que se alcanza el nivel de saturación de la enzima.

Si representamos gráficamente los valores de absorbancia frente a tiempo de la tabla 3:

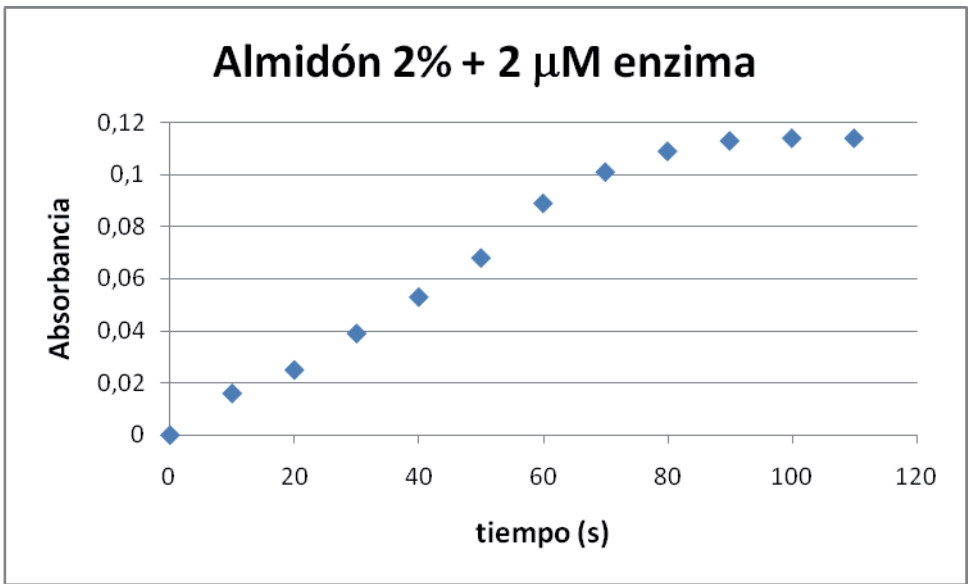


Figura 20. Representación gráfica de la absorbancia frente al tiempo para el almidón con una concentración de la enzima 2µM.

Figura 21. Imagen de la disolución de a) pNA 10 mM y b) una vez añadido el almidón liofilizado con la enzima.

Como se puede observar, el almidón que contiene absorbida a la enzima posee actividad y así lo refleja el color y los datos de absorbancia obtenidos.

Sin embargo, los valores de absorbancia obtenidos son relativamente bajo, por lo que se realizaron otros dos ensayos con 20 y 50 mg de cápsulas en los que se aumentó la concentración de la enzima hasta un valor 70 μM y una disolución 50 mM del sustrato. Los datos obtenidos se representan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Medidas de absorbancia obtenidas con almidón liofilizado con 70 μM de enzima.

[Proteinasa K]			
70 μMolar			
Almidón		Almidón	
20 mg		50 mg	
t (s)	A	t (s)	A
0	0	0	0
5	0.075	5	0.205
15	0.148	15	0.452
30	0.178	30	0.523
65	0.197	65	0.571
100	0.201	100	0.585
115	0.207	115	0.601
130	0.208	130	0.603

Si representamos gráficamente los valores de absorbancia frente al tiempo obtenidos para cada concentración:

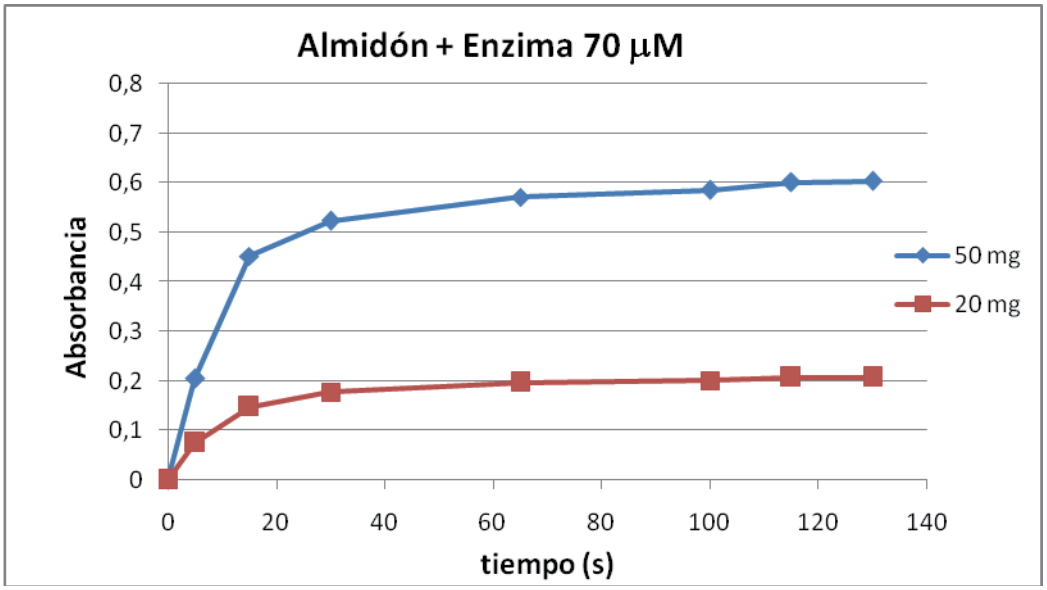


Figura 22. Gráfica de absorbancia frente al tiempo para el almidón liofilizado.

El almidón que contiene una concentración de la enzima 2 µM fue utilizado como aditivo al PLA en una proporción del 1% con el fin de comprobar si durante el proceso de extrusión donde el PLA alcanza una temperatura próxima a los 180ºC, no se producía la desnaturalización de la enzima y por lo tanto, una vez formado el film de PLA la enzima tendría actividad.

Para comprobar si la enzima poseía actividad una vez introducida en el film se recortó tres fragmentos del PLA de diferentes zonas del film, se trocearon en pequeños fragmentos y se sumergieron en una disolución 50 mM del reactivo, con el fin de observar si se producía o no la reacción. Tras un periodo de 4 horas sumergido, no se observaba ningún cambio de color en la disolución. Este hecho fue corroborado mediante medidas de absorbancia.

En este punto se plantearon dos hipótesis diferentes a esta problemática:

1. Desactivación de la enzima: las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de extrusión provocarían la desactivación de la proteinasa K y como consecuencia no se observaría actividad enzimática.

2. El sustrato, que se encuentra disuelto en un medio polar, no podría difundir dentro del film y reaccionar con la enzima debido a la baja polaridad del PLA.

Con el fin de contrastar alguna de las hipótesis citadas con anterioridad, se realizaron dos ensayos diferentes

a) Aumentar la polaridad del PLA mediante la introducción de PEG lo que permitiría una difusión del sustrato hacia el interior del film.

b) Disolución del PLA en algún disolvente orgánico que contenga un 3% de agua para estabilizar a la enzima y posterior extracción con agua y adición sobre una disolución del reactivo.

En la siguiente tabla se muestran los ensayos realizados con 4 tipos de PLA con diferente composición en función de los aditivos que poseen y diferentes disolventes, con el fin de corroborar alguna de las hipótesis anteriores. Obsérvese que cuando se menciona "color" hace referencia a, una vez disuelto el PLA en el disolvente, se aplicó el procedimiento descrito con anterioridad en el apartado b. La concentración de la enzima utilizada para los ensayos fue 2 μM.

Tabla 5. Disolventes utilizados para disolver el PLA.

Disolvente	Film	PEG	¿Se hidrata?	Color
Acetona	26	No	No	No
	27	No	No	
	29	Si	No	
	30	Si	No	
1,4-dioxano	26	No	Si	No
	27	No	Si	
	29	Si	Si	
	30	Si	Si	
Cloroformo	26	No	Si	Si
	27	No	Si	
	29	Si	Si	

	30	Si	Si	
Acetonitrilo	26	No	No	No
	27	No	No	
	29	Si	No	
	30	Si	No	

En el caso del cloroformo como disolvente, no sólo se hidrataba el PLA sino que se producía su disolución.

A la vista de los resultados anteriores, se puede observar un resultado positivo en las medidas de absorbancia. Este hecho demostraría que la enzima no sufre su desactivación en el proceso de extrusión y por lo tanto el problema reside en la polaridad del medio.

En el caso de los films enumerados como 29 y 30, que poseían un porcentaje de PEG 4000 del 4%, no se observaba cambio en la tonalidad de la disolución de reactivo cuando se sumergía el PLA sobre éste. El motivo es debido a que, a pesar de poseer una cantidad de PEG del 4%, la polaridad del film no aumentaba lo suficiente como para facilitar la difusión del reactivo a su interior. Además, el porcentaje de PEG 4000 puede ser aumentado hasta un valor máximo del 30%. Una vez sobrepasado dicho valor, y debido principalmente a su bajo peso molecular, puede provocar una disminución de la T_g.

Ante estos hechos, se decidió modificar el tipo de PEG del film añadiendo un 2% de PEG 4000 y un 3% de PEG 10000 para comprobar si el aumento de la polaridad resulante de la incorporación del PEG 10000 era suficiente como para permitir la difusión del reactivo a su interior.

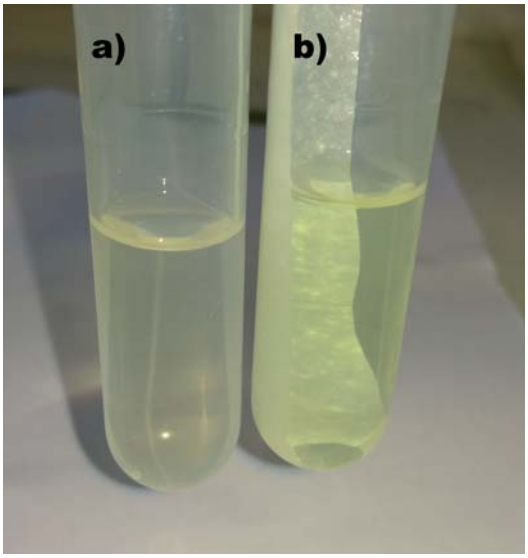


Figura 23. Imagen de a) la disolución patrón de pNA 50 mM y b) con el film BIOM32.

En la figura 23 se puede observar que se produce un cambio en la tonalidad de la disolución lo que implica una difusión del reactivo al interior del film y la reacción. Sin embargo, el nivel de absorbancia obtenido, y por consiguiente de actividad de la enzima, no es lo suficientemente elevado como para poder considerar estas condiciones como óptimas y proceder a incluir el aditivo en el PLA para su desarrollo comercial.

Por ello, se preparó almidón con una disolución de la enzima concentrada (70 μM) que se le proporcionó a la empresa para obtener láminas de PLA. Tras obtener este film (35 y 36, que han sufrido un doble proceso de extrusión) se realizó un ensayo preliminar disolviendo una cantidad del PLA en cloroformo y su extracción con una pequeña cantidad de agua y se adicionó a una disolución 50 mM de pNA. El resultado fue positivo, observándose un color amarillo aunque débil.

B. Obtención de proteinasa K encapsulada sobre compuestos con poder de fertilización.

Los fertilizantes son sustancias orgánicas e inorgánicas ampliamente utilizadas en la industria agrícola para mantener o incrementar el contenido de elementos en el suelo y estimular el crecimiento de las plantas.

Actualmente los fertilizantes más comercializados son los conocidos como NPK debido a que contienen los tres nutrientes primarios para las plantas: nitrógeno, fósforo y potasio.

El propósito de este subobjetivo es conseguir PLA capaz de biodegradarse a mayor velocidad mediante la acción de la proteinasa K y, a su vez, una vez producida su hidrólisis, liberarse al medio diferentes tipos de aditivos con poder de fertilización que sean capaces de estimular el crecimiento de las plantas.

Los aditivos que han sido seleccionados para el cumplimiento de este objetivo son las sales KH_2PO_4 y K_2HPO_4 debido a que poseen dos de los nutrientes principales para las plantas: fósforo y potasio.

Para la preparación del aditivo se realizó una disolución al 2% en masa de las sales, disolviendo 0.27 g de KH_2PO_4 en 10 mL de agua y 0.35 g de K_2HPO_4 en otros 10 mL de agua. A partir de estas disoluciones se realizó una mezcla final con 1 mL de la disolución de dihidrogenofosfato y 4 mL de monohidrogenofosfato y completando hasta un volumen de 10 mL. A la disolución resultante se le adicionó bajo baño de hielo una disolución de la enzima para obtener una concentración 70 μM. Tras una hora, la muestra se congeló y liofilizó.

Figura 24. Imagen a microscopía de 200 aumentos del aditivo con la enzima.

Con el fin de comprobar si la enzima absorbida posee actividad, se realizó un primer ensayo adicionando una pequeña cantidad sobre una disolución del reactivo 50 mM, y observándose un cambio en la tonalidad a amarillo intenso, lo que demuestra la actividad enzimática de la proteinasa K.

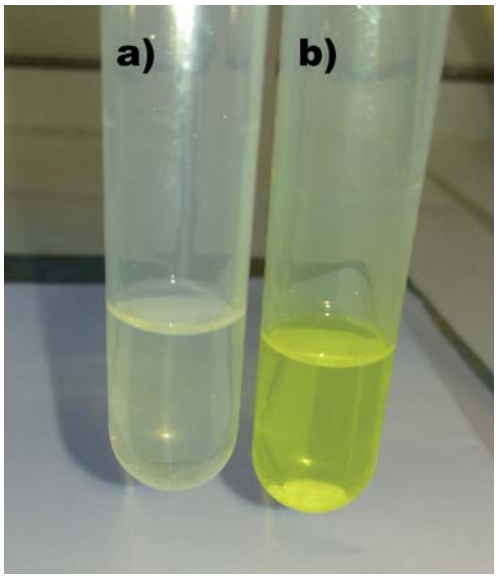


Figura 25. Imagen de a) la disolución patrón de pNA 50 mM y b) una vez añadido el aditivo con la enzima.

Para finalizar se realizaron medidas de absorbancia con dos cantidades diferentes del aditivo (20 y 50 mg) y comparando los resultados obtenidos.

Tabla 6. Medidas de absorbancia obtenidas con el aditivo con poder de fertilización.

[Proteinasa K]			
70 µMolar			
Aditivo		Aditivo	
20 mg		50 mg	
t (s)	A	t (s)	A
0	0	0	0
5	0.042	5	0.168
10	0.067	10	0.231
20	0.080	20	0.240
50	0.091	50	0.273
80	0.099	80	0.297
100	0.102	100	0.306
120	0.104	120	0.312

Si representamos gráficamente los valores obtenidos con anterioridad:

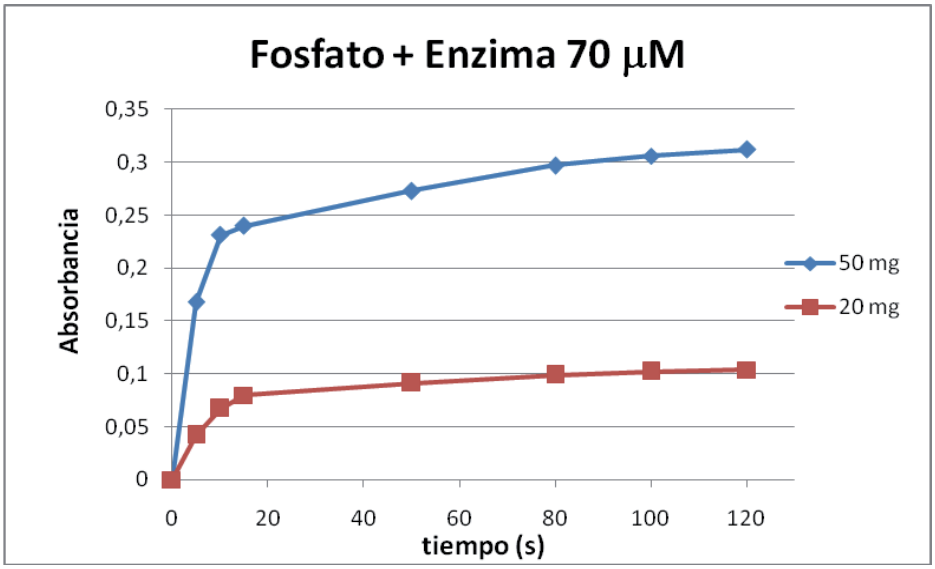


Figura 26. Gráfico de medidas de absorbancia con 20 mg (rojo) y 50 mg (azul) del aditivo.

Para finalizar la caracterización de se incluyó los fosfatos con la enzima liofilizada en el film con un porcentaje al 1% en peso. Los film resultantes (film 35, 36 y 40) se sumergieron en disoluciones de pNA 50 mM y se midió la absorbancia de la disolución a lo largo del tiempo para medir la actividad enzimática de la enzima dentro del film.

La composición de los diferentes film se muestra en la siguiente tabla. En lo referente al film 40 es necesario realizar una precisión y es que se trata de dos tipos diferentes de film con idéntica composición pero las diferencia una modificación en la temperatura del proceso (calentamiento a 4 y 24 horas). Los valores de absorbancia nombrados en la tabla de 1º absorbancia son los obtenidos tras estar en contacto los films con disoluciones de pNA 50 mM durante 30 días. Por su parte, los expuestos en la columna de 2º absorbancia son relativos a la exposición del mismo film con una nueva disolución de la misma concentración del reactivo durante otros 30 días.

Tabla 7. Medidas de absorbancia obtenidas para los films en disolución de pNA.

Film	Composición	1º Absorbancia	2º Absorbancia	% Desactivación
35	6% almidón 9% PEG 4000	0.432	0.386	11
36	12% almidón 5% PEG 4000	0.245	0.187	24
40 - 4h	6% almidón 2% PEG 4000 3% PEG 10000	0.628	0.553	12
40 - 24h		0.564	0.501	11

Algunos datos importantes a destacar es que se obtiene mayor valor de absorbancia para el film 35 con respecto al 36 debido a que posee mayor porcentaje PEG. En lo referente al film 40, se obtiene un mayor valor del sometido durante 4 horas a calor con respecto al de 24 horas.

Si representamos gráficamente los valores de absorbancia para cada film de ambos meses, podemos observar que se obtiene una disminución de la misma, observándose una desactivación de la enzima del 11-12% para todos los casos excepto para el film 36 que alcanza un 24%.

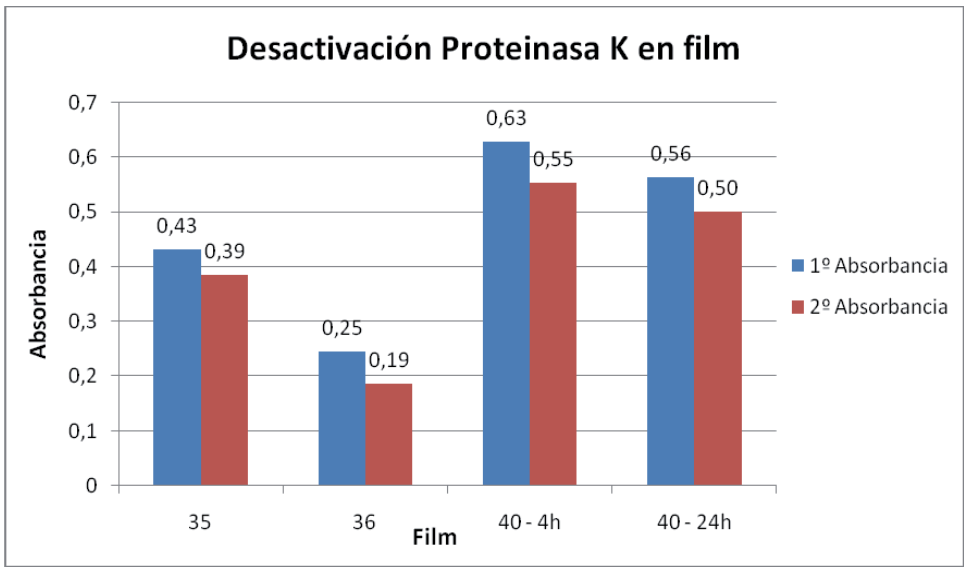


Figura 27. Gráfico de medidas de absorbancia para los films sumergidos en disolución de pNA 50mM.

1.2.2 Obtención de microencapsulados de proteinasa K

La microencapsulación se define como una técnica de sellado de sólidos, líquidos o materiales gaseosos en forma de cápsulas en miniatura y con tamaños que varían desde una micra hasta cientos de micras

Una microcápsula está formada por dos elementos claramente diferenciados: el núcleo, que contiene el material activo, y una cáscara de otro material que envuelve al primero.

La morfología de las microcápsulas depende tanto del material que forma el núcleo como del proceso de deposición del material de cáscara. Según su morfología las microcápsulas se clasifican en tres grupos:

- Mononuclear: el núcleo está confinado en el interior, rodeado por el material de cáscara.
- Polinuclear: contienen varios núcleos, separados entre sí por el material de cáscara.
- Matricial: el material del núcleo está distribuido uniformemente dentro del material de cáscara.

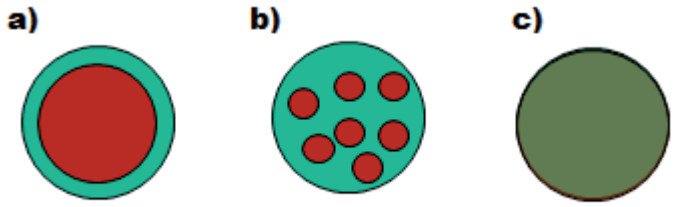


Figura 28. Morfología de las microcápsulas: a) mononuclear, b) polinuclear y c) matricial.

En este objetivo, el núcleo estará formado por una sustancia líquida que contendrá disuelta a la enzima y el material de cáscara estará formado por alginato.

El material utilizado para la microencapsulación debe cumplir una serie de requisitos:

- formar una buena película cohesiva
- no reaccionar con el material a encapsular
- ser solubles en algún disolvente
- no ser higroscópicos ni muy viscosos
- proporcionar las propiedades deseadas para el recubrimiento (flexibilidad, impermeabilidad, estabilidad, etc).

Para la formación de las microcápsulas se utiliza una pistola y un compresor de aire de gran potencia equipado con un motor para cargar el depósito.

Figura 29. Compresor utilizado para el desarrollo de este proyecto.

Este compresor se conecta directamente a la pistola difusora y permite la nebulización de la mezcla. El motor se activa cada vez que el depósito de aire baja de una cierta presión para volver a cargarlo, con lo que siempre se mantiene una presión que garantiza el suministro a la pistola.

En lo que respecta a la pistola, está formada por un sistema de tres vías que se especifican a continuación:

- vía 1 donde circula el caudal de aire procedente del compresor
- vía 2 donde circula el material de cáscara
- vía 3 donde circula el material de núcleo.

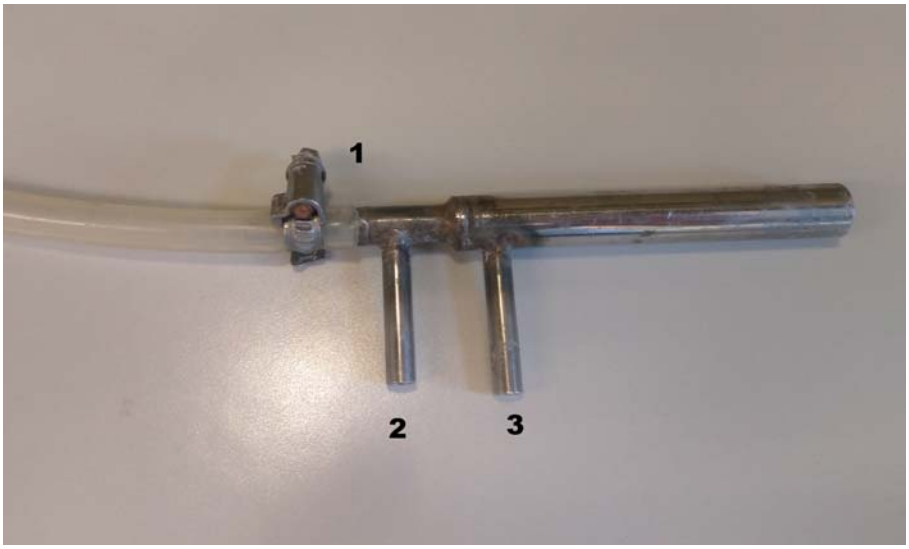


Figura 30. Pistola utilizada para la formación de las microcápsulas.

La pistola anterior permite obtener pequeñas cantidades de microcápsulas. Para la obtención de grandes cantidades a escala industrial se dispone de un dispositivo multipistola como la anterior.

Figura 31. Dispositivo multipistola utilizada para la formación de las microcápsulas a escala industrial.

Del mismo modo que en el caso de la pistola simple, posee tres vías:

- una vía superior donde se inyecta el material de cáscara
- una vía central donde circula el caudal de aire procedente del compresor
- una vía inferior donde circula el material de núcleo

En lo que respecta a la medida de la actividad enzimática de las microcápsulas se utiliza un sistema continuo formado por el espectrofotómetro Perkin Lambda 35 y un circuito formado por una bomba peristáltica que genera un flujo de la disolución a través de un sommlet en el que se encuentran las microcápsulas.

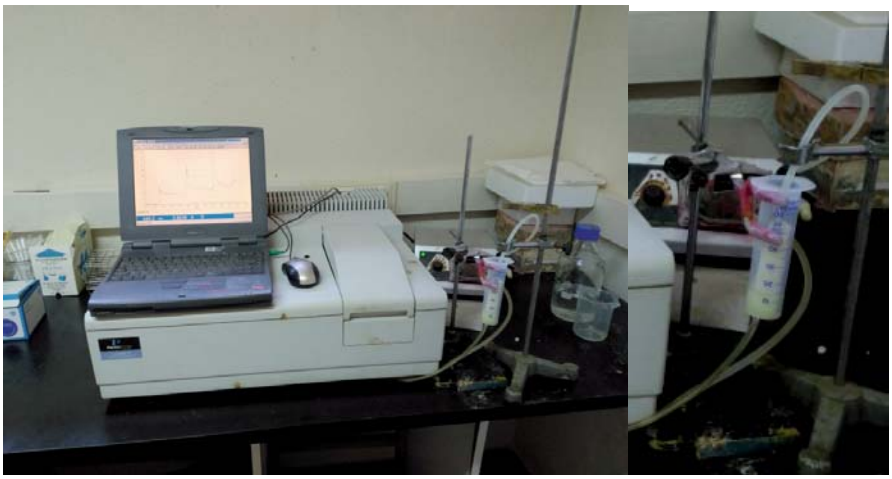


Figura 32. Espectrofotómetro y sistema de medida continua con bomba peristáltica.

A. Obtención de microcápsulas de alginato sódico.

El alginato es un polisacárido lineal no ramificado formado por unidades de ácido β-D-manurónico (M) y α-L-gulurónico (G) que se distribuyen en secciones formando homopolímeros (-GGG-, -MMM-) o heteropolímeros (-MGMG-). La proporción y distribución de los monómeros en la cadena polimérica es determinante para la flexibilidad o rigidez de dicha estructura, pues un mayor contenido en bloques -G- es característico de geles más rígidos y compactos, mientras que una mayor proporción de bloques -M- tiene una consistencia más suave y elástica[18,19].

[18] Lupo, B.; González, C.; Maestro, A. *Rev. Venez. Cienc. y Tecnol. Aliment.* **2012**, *3*, 130.

[19] Paredes, G.A.; Spasojevic, M.; Faas, M.M.; Vos, P. *Front. Bioeng. Biotecnnol*. **2010**, *2,* 2198.

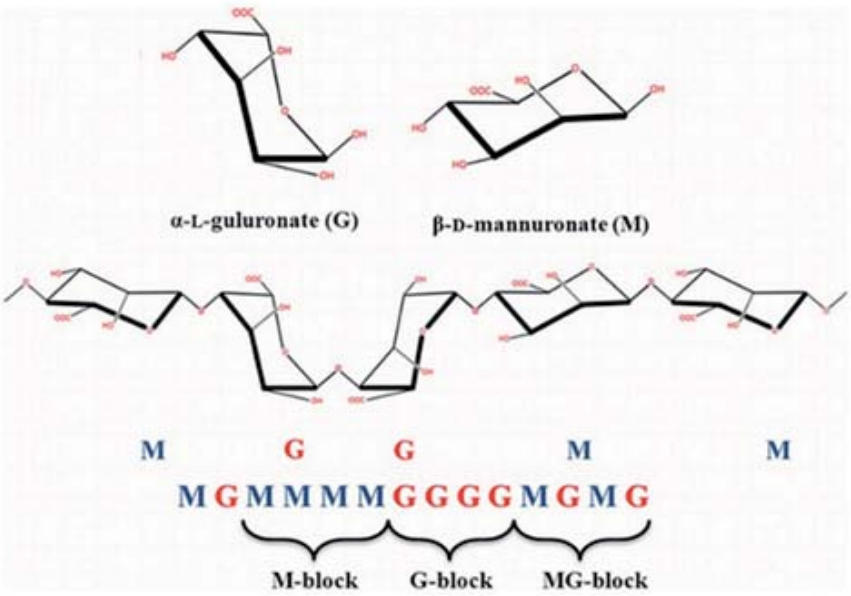


Figura 33. Representación del ácido α-L-glurónico (G) y β-D-manurónico (M).

El alginato es un polímero ampliamente utilizado como material de cáscara en los métodos de microencapsulación por las ventajas que presenta:

- Industria farmacéutica: es biocompatible, no tóxico y degradable, por lo que puede usarse como "vehículo" del fármaco en el organismo hacia el órgano o tejido diana en el que actúe.
- Alimenticia: es comestible, por lo que ha sido utilizado para encapsular sabores, vitaminas, ácidos grasos, proteínas, aminoácidos, etc.

El objetivo de este subapartado es obtener microcápsulas formadas por una cáscara de alginato sódico y en cuyo núcleo se encuentre la proteinasa K.

Para la formación de las microcápsulas fue necesario preparar una disolución al 2% en peso de alginato sódico en agua y posteriormente enfriada bajo baño de hielo para la adición de la proteína. A continuación, se pulverizó la disolución con ayuda de una pistola y un compresor sobre un baño de acetona frío, formándose las cápsulas. Una vez formadas, se filtraron en papel de filtro y antes de caer toda la acetona se les añadió hexano para endurecer la cáscara de alginato.

Figura 34. Imagen a microscopio de 200 aumentos de las cápsulas de alginato de sodio.

Para comprobar la actividad enzimática de las cápsulas, se realizó un ensayo de medidas de absorbancia con 50 mg de las microcápsulas de alginato de sodio que contenían una disolución de la enzima 0.7 μM y una concentración de sustrato 10 mM. Las medidas obtenidas están representadas en la tabla siguiente.

Tabla 8. Medidas de absorbancia obtenidas con cápsulas de alginato de sodio y una concentración de la enzima 0.7 μM.

Cápsulas		[Proteinasa K]	
50 mg		0.7 μMolar	
t (s)	A	t (s)	A
0	0	60	0,026
10	0,002	70	0,032
20	0,007	80	0,036
30	0,009	90	0,037
40	0,012	100	0,037
50	0,018	110	0,037

Como se puede observar en la tabla anterior, los valores de absorbancia son relativamente bajos. Si representamos gráficamente la absorbancia frente al tiempo:

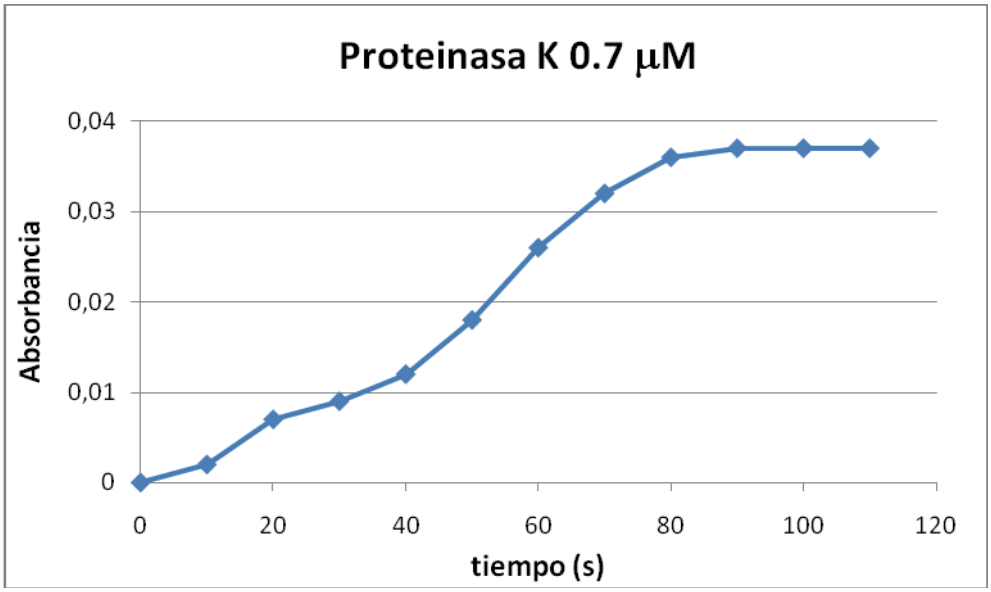


Figura 35. Representación gráfica de la absorbancia frente al tiempo para las cápsulas de alginato con una concentración de la enzima 0.7 µM.

Se realizó un segundo ensayo aumentando la concentración de la enzima hasta 2 µM con el fin de observar un aumento de la absorbancia y, por consiguiente, de la actividad enzimática. Las condiciones en las medidas fueron las mismas a las desarrolladas en el ensayo anterior. Las medidas están representadas en la tabla siguiente:

Tabla 9. Medidas de absorbancia obtenidas con cápsulas de alginato y una concentración de la enzima 2 µM.

Cápsulas		[Proteinasa K]	
50 mg		2 µMolar	
t (s)	A	t (s)	A
0	0	60	0,078
10	0,009	70	0,092
20	0,019	80	0,095
30	0,029	90	0,096

Representando gráficamente los valores de absorbancia y tiempo anteriores:

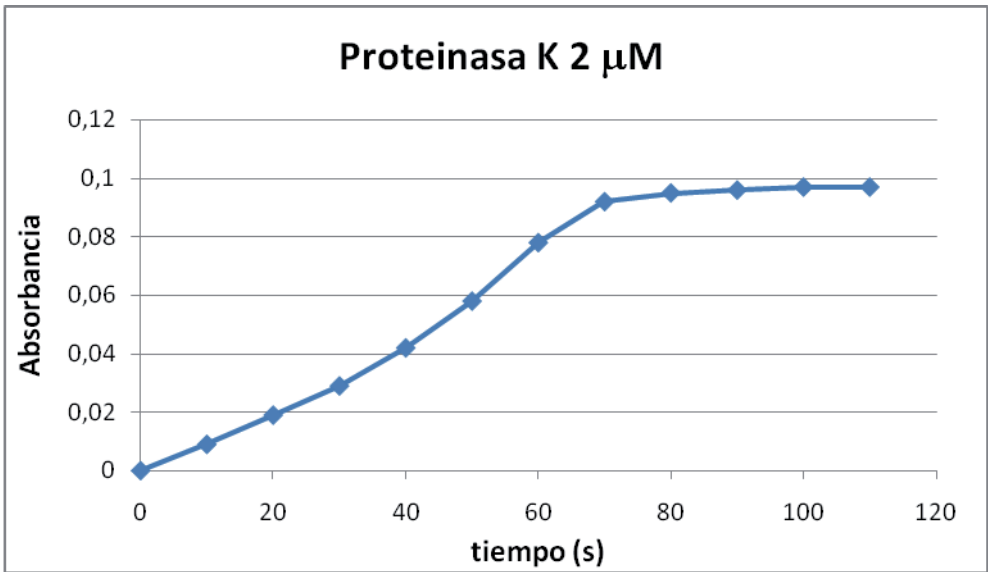


Figura 36. Representación gráfica de la absorbancia frente al tiempo para las cápsulas de alginato de sodio con una concentración de la enzima 2 µM.

A partir de los datos anteriores y los obtenidos en el apartado 1.2.1-A para el uso de almidón liofilizado, se puede observar cómo se consigue una mayor actividad enzimática para el almidón. Sin embargo, es necesario comprobar la actividad enzimática tras la extrusión del film en ambos compuestos y su durabilidad a lo largo del tiempo.

B. Obtención de microcápsulas de alginato de calcio.

El objetivo de este apartado es obtener microcápsulas de alginato de calcio a partir de alginato de sodio que contengan en su interior una disolución de la enzima.

Las sales derivadas del ácido algínico poseen cavidades entre las cadenas entrecruzadas, lo que permite acomodar cationes, como es el caso del ion calcio. La adición de este ión a una disolución de alginato de sodio provoca cambios conformacionales en la estructura del alginato, dando lugar al conocido como modelo de gelificación tipo "caja huevo"[20,21].

[20] Avendaño-Romero, G.C.; López-Malo, A.; Palou, E. *Ingeniería de los alimentos*, **2013**, *7*, 87.

[21] Reddy, R.; Reddy, S. *Int. J. PharmTech. Res.* **2010**, *2*, 2198.

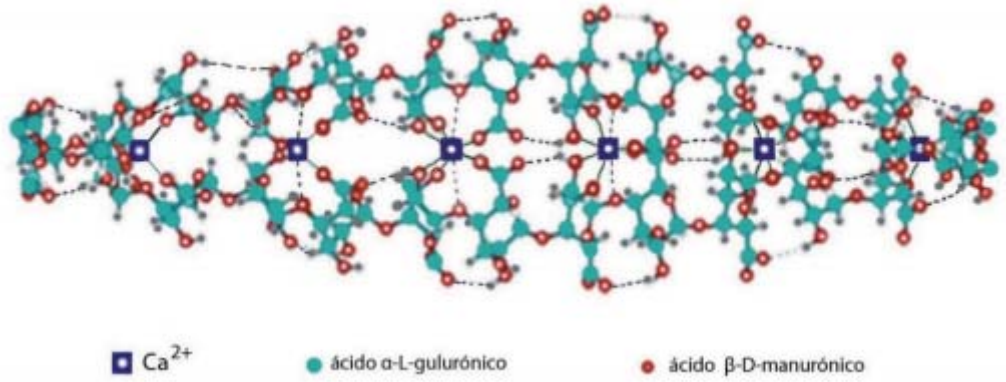


Figura 37. Modelo "caja de huevo" que describe la estructura del alginato con iones calcio.

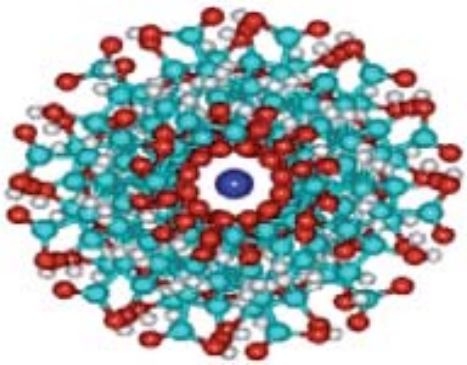


Figura 38. Representación de una hélice de poli-α-L-guluronato entrecruzada con calcio.

Las cápsulas de alginato de calcio se obtuvieron con un proceso similar al descrito en el apartado A de este objetivo. En primer lugar fue necesario preparar una disolución al 2% en peso de alginato de sodio y un 10% de almidón con respecto a la concentración de alginato. A la mezcla se adicionó bajo baño de hielo una disolución de la enzima para obtener una concentración 70 μM de ésta y se dejó en agitación durante una hora. Pasado este tiempo, se pulverizó sobre una disolución saturada de $CaCl_2$ y las cápsulas obtenidas se filtraron, se congelaron y liofilizaron.

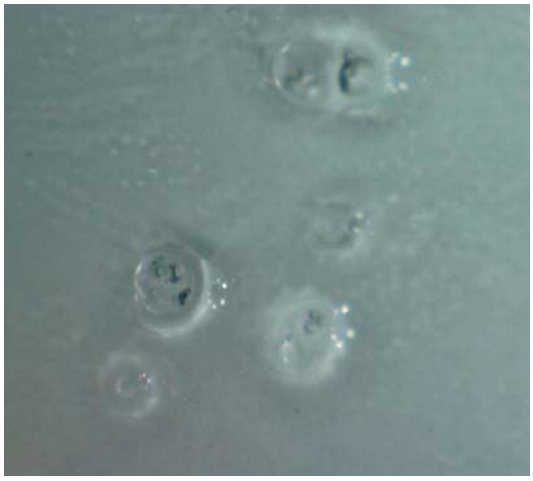


Figura 39. Imagen de las cápsulas de alginato de calcio a microscopio de 200 aumentos.

Con el fin de conocer el tamaño de las microcápsulas de alginato de calcio se observaron con microscopio de barrido en el Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales en la Universidad de Murcia. Para llevar a cabo el proceso, las microcápsulas son previamente secadas en un horno durante 24 horas a una temperatura de 40 ºC. Posteriormente, se deposita sobre las mismas una fina capa de oro de 30Å de espesor.

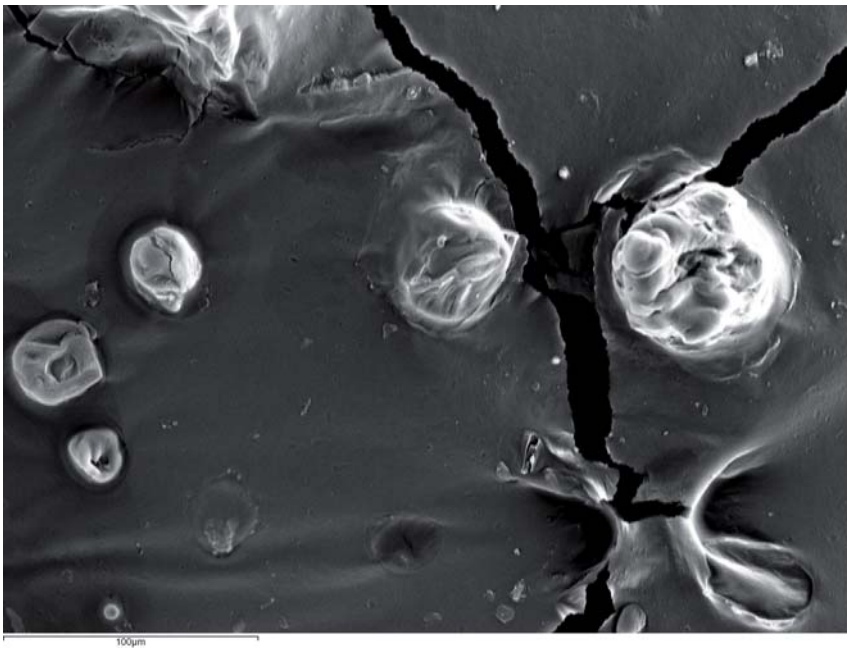


Figura 40. Imagen de las cápsulas de alginato de calcio con microscopio de barrido a 350 aumentos.

Figura 41. Imagen de las cápsulas de alginato de calcio con microscopio de barrido a 750 aumentos.

El tamaño de las microcápsulas varía desde las 10 a 60 micras de diámetro.

Para comprobar la actividad enzimática de las cápsulas de alginato de calcio se realizó un ensayo de medidas de absorbancia utilizando 50 mg de las cápsulas y una disolución 50 mM del sustrato. El resultado obtenido fue que no se observaba absorbancia en un tiempo de medida de 2 minutos.

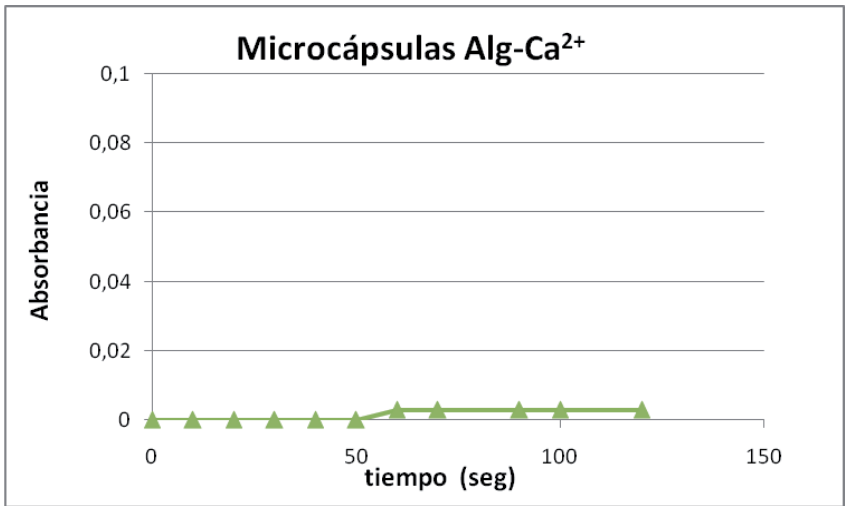


Figura 42. Gráfica de absorbancia frente a tiempo para las microcápsulas de alginato de calcio.

Con el fin de comprobar si se trataba de un proceso de reacción lento se dejaron las microcápsulas en disolución de reactivo durante una semana, en el que el resultado volvió a ser negativo. La explicación a este hecho reside en la elevada compactación

que poseen dichas cápsulas lo que podría dificultar el acceso del sustrato (de carácter orgánico) dentro de las mismas.

Por ello se añadió una cantidad de agua saturada de NaCl observándose que sí aumentaba el color y por lo tanto la formación de producto. Esto es debido a que existe una competición entre los iones Ca^{2+} y Na^{+} lo que provoca la expansión de la cápsula y facilita el proceso de difusión del sustrato dentro de la misma.

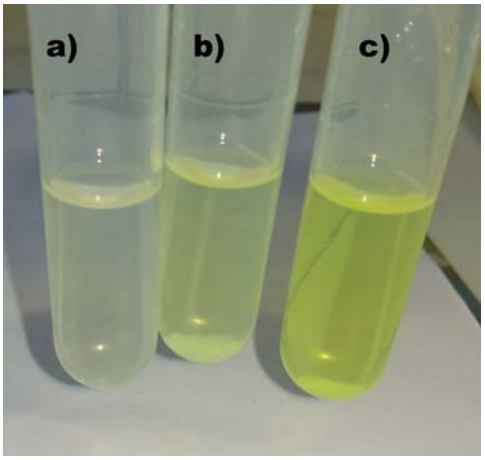


Figura 43. Imagen de a) patrón de pNA 50 mM, b) con las cápsulas y c) con las cápsulas y el NaCl.

La adición de concentraciones crecientes de NaCl (10, 15, 20% v/v respectivamente) da como resultado una serie de gráficas en las que se observa un pico al principio y un nivel basal sin apenas cambios al pasar aproximadamente 1 o 2 minutos desde que se añadió el NaCl. Se empieza a medir sin esperar reacción hasta que a los 60 segundos se adiciona el volumen correspondiente de disolución de NaCl.

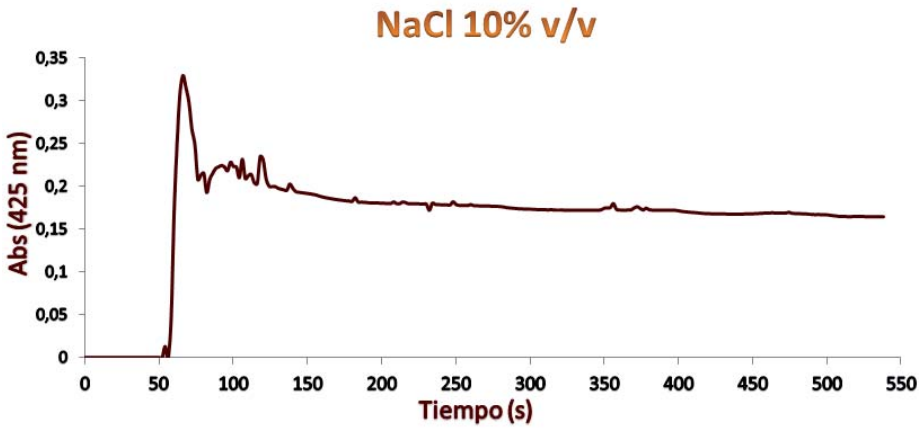


Figura 44. Representación gráfica de las medidas de absorbancia del PNP en función del tiempo con NaCl 10% v/v.

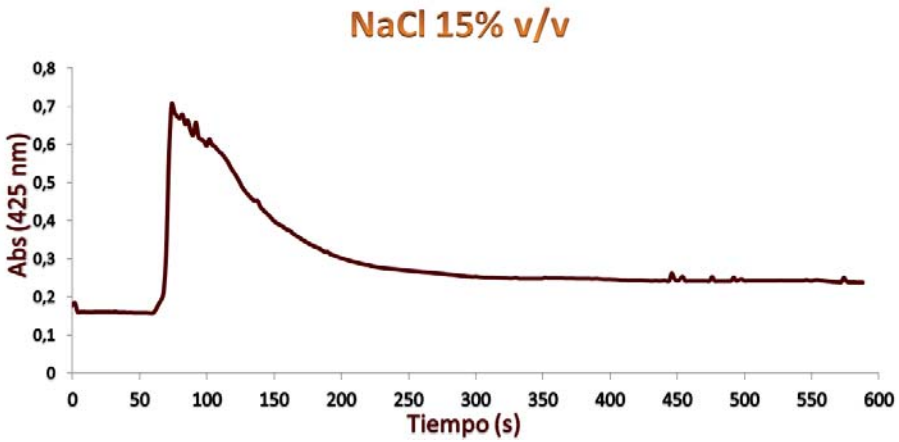


Figura 45. Representación gráfica de las medidas de absorbancia del PNP en función del tiempo con NaCl 15% v/v.

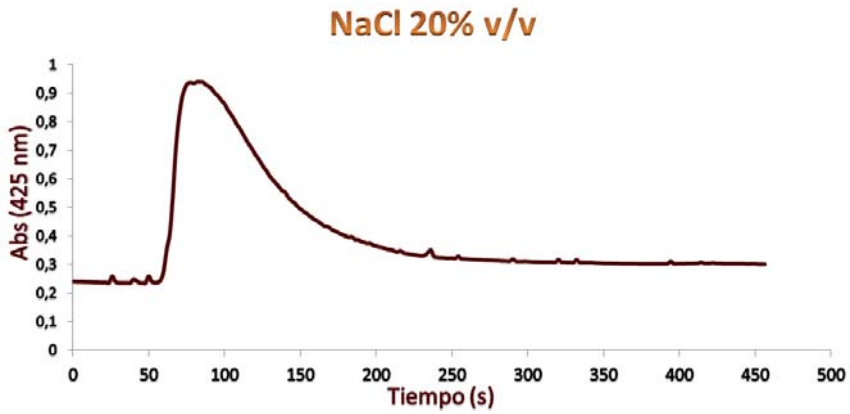


Figura 46. Representación gráfica de las medidas de absorbancia del PNP en función del tiempo con NaCl 20% v/v.

A partir de estos datos no es posible calcular los parámetros cinéticos de la proteinasa K microencapsulada por lo que se han tomado los valores de absorbancia más representativos, que aparecen recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 10. Valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de NaCl.

NaCl (% v/v)	**Abs inicial (t = 60s)**	**Abs (pico máximo)**	**Abs final (t = 400s)**
10% v/v	0,000	0,329	0,171
15% v/v	0,159	0,707	0,247
20% v/v	0,246	0,941	0,302

Se toma como valor de absorbancia inicial el momento previo a adicionar la disolución de NaCl correspondiente, que es a los 60 segundos desde que se inició la medición. Tras 400 segundos se toma el valor de absorbancia final, que se mantiene prácticamente constante. Puesto que el aumento de concentración de NaCl en el volumen total del sistema se hizo de manera continua, la absorbancia final de un proceso está directamente relacionada con la absorbancia al inicio del siguiente.

Cuando se mide el producto de una reacción enzimática monosustrato a lo largo del tiempo, como es el caso de la reacción catalizada por la Proteinasa K, se espera encontrar una gráfica que describa un aumento inicial no lineal de la concentración de producto y una estabilización de dicha concentración tras haber transcurrido un tiempo (es decir, se alcanzaría el equilibrio de la reacción). Sin embargo, las medidas tomadas durante el ensayo muestran una subida abrupta de la concentración de producto apenas unos segundos después de adicionar el volumen de la disolución de NaCl, para después disminuir y estabilizarse en torno a un valor de absorbancia concreto.

En base a estos resultados se puede afirmar que ocurren dos acontecimientos que no se corresponden con una actividad enzimática normal: la disminución del valor de absorbancia y la estabilización del mismo tras unos minutos.

La explicación a estos fenómenos radica principalmente en una cuestión operativa. Las microcápsulas se encuentran retenidas en una jeringa abierta, que a su vez constituye la entrada del circuito continuo, de forma que todo lo que entra al circuito atraviesa en primer lugar a las microcápsulas. Al adicionar la disolución de NaCl saturada, la concentración de esta sal aumenta drásticamente en el entorno de las microcápsulas, lo que produce la apertura de las cápsulas, permitiendo así la reacción. Sin embargo, la reacción se produce sólo cuando la concentración local de NaCl es muy elevada, pues a los pocos segundos el valor de absorbancia desciende considerablemente, lo que podría interpretarse como la dilución del producto formado en todo el volumen del sistema. La concentración de NaCl en el entorno de las microcápsulas también se diluye en el volumen total del sistema, dando lugar a las disoluciones de 10, 15 y 20% v/v que se pretendían, pero cuando esto se logra el valor de absorbancia se estabiliza y no aumenta, lo cual indica que no se produce reacción.

En resumen, la reacción enzimática solo se produce con una gran concentración de NaCl en el entorno de las microcápsulas, ya que de otro modo la envoltura no permite la difusión de los reactivos. En base a esto se obtienen las conclusiones siguientes:

1. El pico de absorbancia corresponde al producto formado en ese breve lapso de tiempo, cuando atraviesa por primera vez la cubeta.
2. El descenso de absorbancia se debe a la dilución del producto formado en todo el volumen del sistema.
3. La estabilización del valor de absorbancia se produce por la ausencia de reacción enzimática posterior.
4. Son necesarias concentraciones mayores de NaCl para facilitar una reacción continuada.

Si bien es cierto que la estabilización del valor de absorbancia se consigue al llegar al equilibrio de la reacción cuando se trabaja con enzimas monosustrato, lo cierto es que no se puede decir que eso sea lo que ha ocurrido en este ensayo, ya que si realmente se hubiera alcanzado el equilibrio no se habría producido un aumento de absorbancia al adicionar mayores concentraciones de NaCl (puesto que la enzima habría consumido todo el reactivo). Por tanto, la situación se asemeja más a una reacción detenida que a una reacción en equilibrio.

Por último, se proporcionó a la empresa una cantidad de microcápsulas para introducirlas dentro de un film aunque los resultados obtenidos no fueron buenos. Las cápsulas poseían una elevada cantidad de agua (como consecuencia del proceso de fabricación) lo que generaba un film con numerosos agujeros.

Figura 47. Film que posee las microcápsulas de alginato de calcio.

A raíz de los datos obtenidos con anterioridad se puede descartar las microcápsulas de alginato de calcio como aditivo al PLA debido a dos consecuencias: en primer lugar, la dificultad de las cápsulas para poder actuar dentro del film ya que al ser tan compactas el tiempo de degradación aumentaría de manera considerable y por último el tamaño de las microcápsulas que supondrá un problema cuando se pretenda reducir el tamaño del film.

1.2.3 Encapsulación de proteinasa K

A. encapsulación de proteinasa K directamente sobre PLA.

La inmovilización de enzimas sobre soportes de tipo polimérico ha sido ampliamente investigada debido a su gran aplicabilidad a nivel industrial. Algunas de las ventajas que presenta este proceso son el aumento de la estabilidad de la enzima o la posible reutilización del derivado.

El objetivo es inmovilizar la enzima proteinasa K sobre poliláctico extruido. Para ello se realizó un ensayo preliminar que consistía en sumergir un trozo de PLA (32, que posee almidón como aditivo) durante 12 horas en una disolución de la enzima 10 μM a una temperatura de 4ºC. Tras pasar este tiempo, el poliláctico se lava con abundante disolución tampón para eliminar los restos de proteinasa K que no se hayan adsorbido y se sumerge en una disolución de pNA (25 mM) durante 24 horas. Al finalizar se observa un pequeño cambio de color por lo que se propone realizar un segundo ensayo aumentando la concentración de la enzima y del reactivo. Así se sumerge el PLA en una disolución 70 μM de la enzima durante 12 horas y posteriormente, siguiendo el procedimiento anterior, se sumerge en una disolución 50 mM de pNA. En esta ocasión el cambio observado fue elevado.

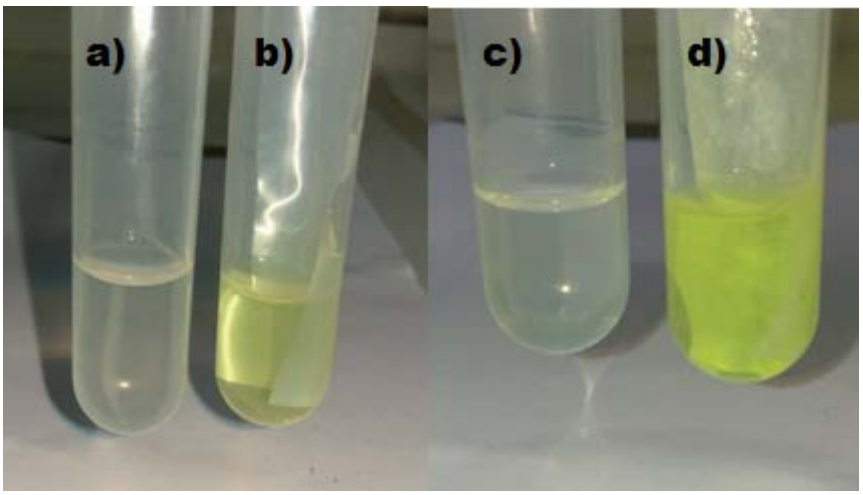


Figura 48. Comparación de los PLA con la enzima inmovilizada. A) Disolución pNA 25 mM, b) disolución tras sumergir el PLA previamente inmovilizada la enzima (10 μM), c) disolución de pNA 50 mM y d) disolución tras sumergir el PLA previamente inmovilizada la enzima (70 μM).

Por último se decidió realizar un ensayo de medida de absorbancia de cuatro muestras de PLA, que contienen diferentes aditivos. Para ello se siguió el procedimiento

anterior descrito, modificando únicamente las concentraciones de enzima y sustrato (70 μM de enzima y 200 mM de pNA). Para ello se recortaron trozos de los film con un área idéntica al lateral de la cubeta del espectrofotómetro para poder realizar una comparativa.

Los films seleccionados fueron los enumerados como: 3, 22, 30 y 32. En la tabla siguiente se muestran los aditivos de cada tipo de film.

Tabla 11. Tipos de PLA utilizados según el aditivo que contienen.

Film	Aditivo	Porcentaje
3	Sin aditivo	-
22	Almidón	9
30	PEG 4000	4
32	PEG 4000 Almidón Glicerol	5 6.7 3.3

En la tabla siguiente se muestran las medidas de absorbancia obtenidas para cada uno de los film.

Tabla 12. Medidas de absorbancia para los film con la enzima inmovilizada.

	BIOFM3	BIOMF22	BIOMF30	BIOMF32
t (min)	A			
0	0	0	0	0
2	0	0	0	0,103
4	0	0	0	0,256
6	0	0,002	0,003	0,323
8	0,005	0,006	0,005	0,401
10	0,007	0,008	0,007	0,412
12	0,009	0,009	0,011	0,41
14	0,009	0,01	0,016	0,41
16	0,009	0,011	0,017	0,41
18	0,009	0,011	0,018	0,41
20	0,009	0,011	0,018	0,41

Debido a que los valores obtenidos son muy diferentes en algunos casos, resulta complejo realizar una única gráfica ya que no se observaría con detalle la comparación de algunas de las medidas. Por ello se realizarán dos gráficas diferentes, en primer lugar con los film 3, 22 y 30 y otra únicamente con el film 32.

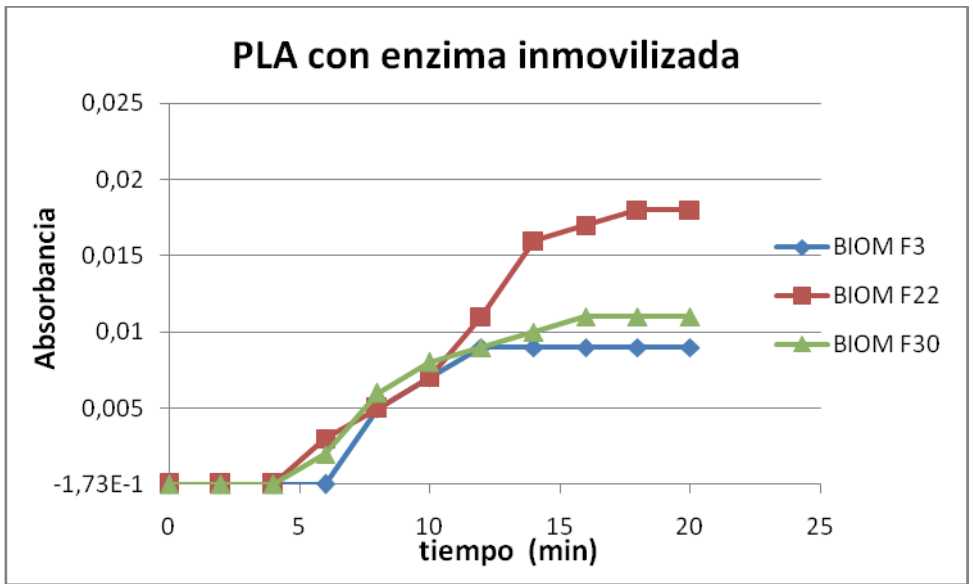


Figura 49. Gráfica con las medidas de absorbancia frente a tiempo para tres tipos de PLA con la enzima inmovilizada.

En la gráfica anterior se puede observar como el valor máximo obtenido no supera las 0.02 unidades de absorbancia, lo que implica que la inmovilización de la enzima en el PLA es insignificante.

Por último, representando gráficamente los valores obtenidos para el film 32:

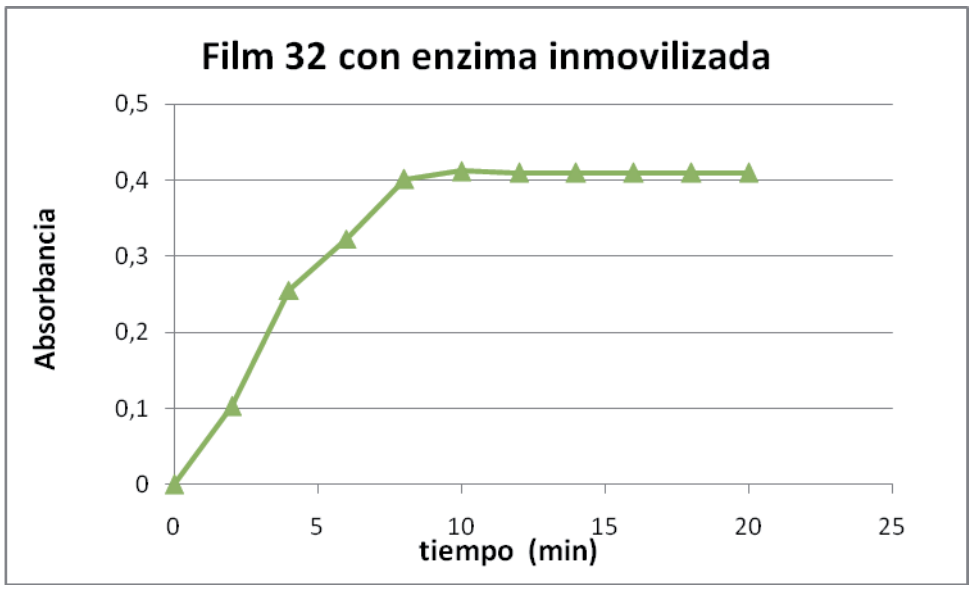


Figura 50. Gráfica de absorbancia frente a tiempo para el film 32 con la enzima inmovilizada.

En este caso, a pesar de medir una absorbancia que indicaría la inmovilización de la enzima sobre el PLA, realmente no ocurre dicho proceso. Obsérvese que en el caso del film 3 no se produce la adsorción de la enzima ya que no hay valores de absorbancia, por lo que en el film 32 que posee almidón y PEG como aditivos, se produce la absorción de la enzima durante el proceso de inmovilización y por lo tanto que se observe posteriormente la actividad enzimática.

B. Encapsulación de proteinasa K sobre cinamatos.

Los cinamatos son compuestos orgánicos con enlaces tipo éster formados entre un polialcohol y un cloruro de ácido.

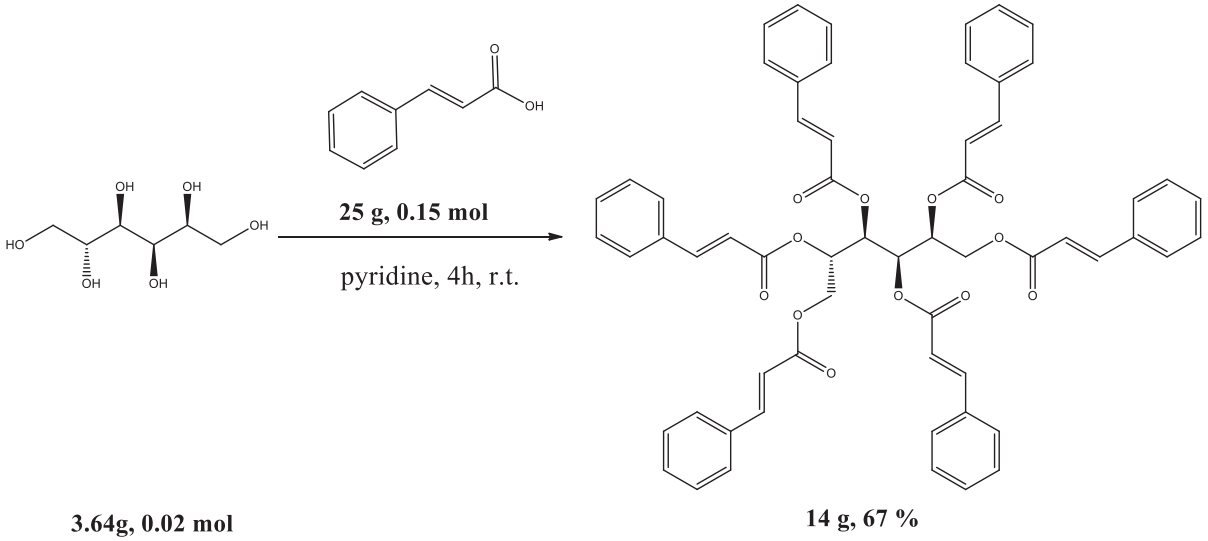
Preparación del cinamato de sorbitol[22].

Se disuelve el sorbitol (3.65g, 0.02 moles) en 100 mL de piridina en un matraz de doble boca con un tubo de $CaCl_2$, y dejamos la mezcla durante 1 hora a 60ºC para facilitar la disolución total del polialcohol. Finalizado este tiempo se adiciona lentamente un exceso del cloruro de cinamoilo (25 gramos, 0.15 moles) para poder acetilar todos los grupos alcoholes del sorbitol y se deja en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, la mezcla con el producto de la reacción se vierte sobre agua destilada fría fuertemente agitada. Se obtiene un precipitado de color anaranjado y apariencia pastosa, que se separa de la mezcla por filtración.

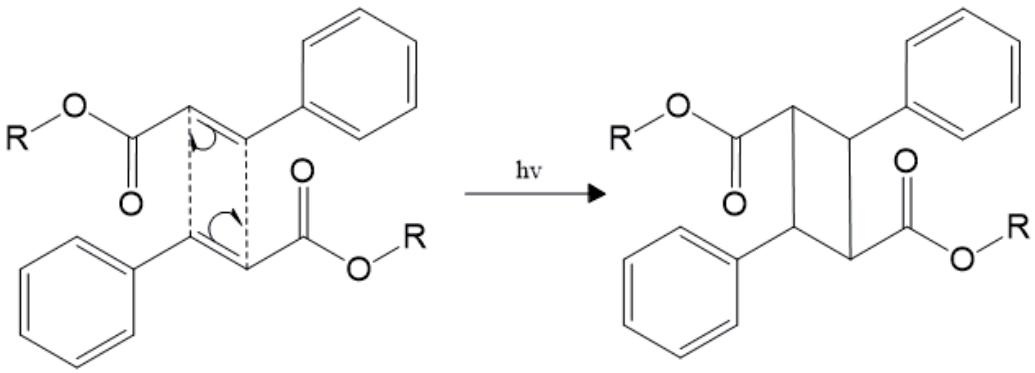
Se disuelve el producto obtenido en 70 mL de cloroformo, y se añade a un embudo de decantación. Posteriormente, se adiciona gota a gota la disolución de cloroformo sobre hexano fuertemente agitado. El precipitado obtenido se filtra y se guarda en un bote topacio para evitar su contacto a la luz. El rendimiento de la reacción es del 67%.

[22] Rojas-Melgarejo, F.; Rodríguez-López, F.N.; García-Cánovas, F.; García-Ruíz, P.A. *Process Biochem*, **2004**, *39*, 1455.



Esquema 2.Síntesis del cinamato de sorbitol

Es necesario mantener el cinamato de sorbitol oculto a la luz solar debido a que ésta provoca una fotodimerización de los dobles enlaces presentes en la molécula, mediante una reacción de cicloadición [2+2].



Esquema 3. Reacciónd e fotodimerización de los dobles enlaces del cinamato.

Una vez obtenido el cinamato de sorbitol se llevó a cabo un ensayo con el fin de conocer el tiempo necesario que deben estar en contacto el cinamato y la disolución de proteinasa K para su adsorción.

Para ello se adicionó a disoluciones 100 mM de proteinasa K 0,5 gramos del cinamato y se dejaron en agitación y bajo baño de hielo. Los tiempos y las absorbancias obtenidas para 50 mg del cinamato se muestran a continuación:

Tabla 13. Medidas de absorbancia de los distintos tiempos de inmovilización de la enzima en cinamato.

Tiempo (minutos)	30	60	90
Absorbancia	0.152	0.193	0.107

En la tabla 13 se puede observar que el tiempo necesario para que se produzca la inmovilización de la enzima sobre cinamato es de una hora.

Una vez obtenidos los tiempos de adsorción, se incorporó un 1% en peso del cinamato en el PLA con el objetivo de comprobar la compatibilidad entre ambos materiales. Tras obtenerse un film con buenas propiedades se procede a inmovilizar la enzima sumergiendo el film en disoluciones de la misma. El proceso se deja durante 12 horas en una disolución de proteinasa K 70 mM. Finalizado este tiempo, el film se lava con agua para eliminar los restos de enzima que no hayan quedado adheridos y se sumerge en una disolución de pNA 50 mM.

En la siguiente tabla se muestran las medidas de absorbancia obtenidas para los diferentes tiempos:

Tabla 14. Medidas de absorbancia para los film con la enzima inmovilizada.

t (días)	A
0	0
10	0.212
20	0.452
30	0.624
40	0.635
45	0.635

Si representamos gráficamente los valores obtenidos en la tabla anterior:

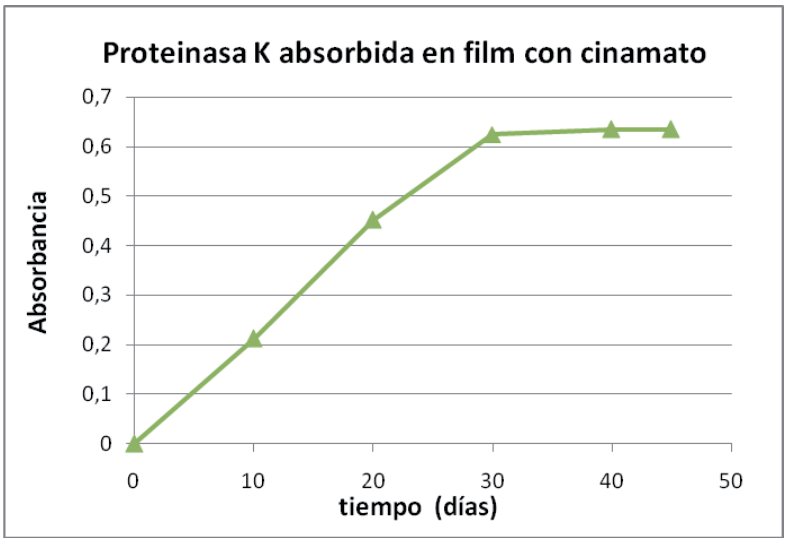


Figura 51. Gráfica de absorbancia frente a tiempo para el BIOM F32 con la enzima inmoviliada.

Objetivo 2. Investigación y obtención de nuevas formulaciones de polibutilen-adipato-co-tereftalato con mayor capacidad de degradación con encapsulación de enzimas.

El polibutilen-adipato-co-tereftalato (PBAT) es un co-polímero alifático que ha surgido en los últimos años y que se ha convertido en la alternativa al polietileno de baja densidad (LDPE) por su carácter biodegradable y por sus propiedades de flexibilidad y resiliencia similares[23].

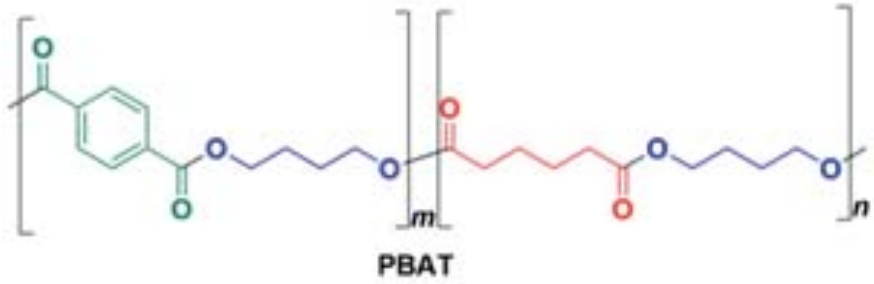
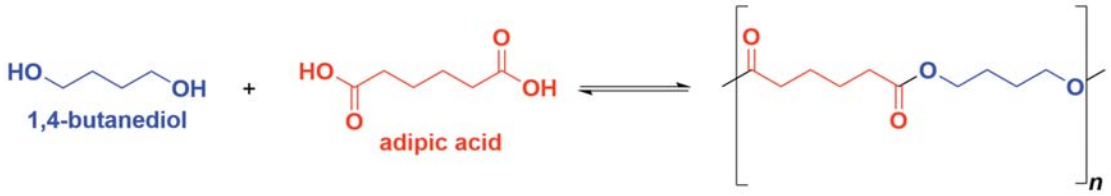


Figura 52. Estructura del PBAT

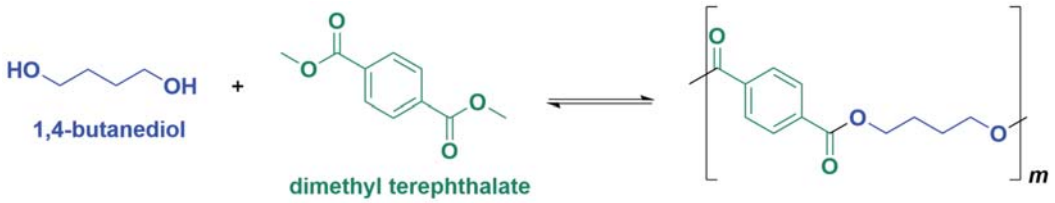
El PBAT es fabricado a partir de 1,4-butanodiol, ácido adípico y dimetil tereftalato (TDM). La síntesis comienza con la formación de un poliéster resultante de la formación de enlaces éster entre el 1,4-butanodiol y el ácido adípico.



Esquema 4. Poliéster formado a partir de 1,4-butanodiol y ácido adípico.

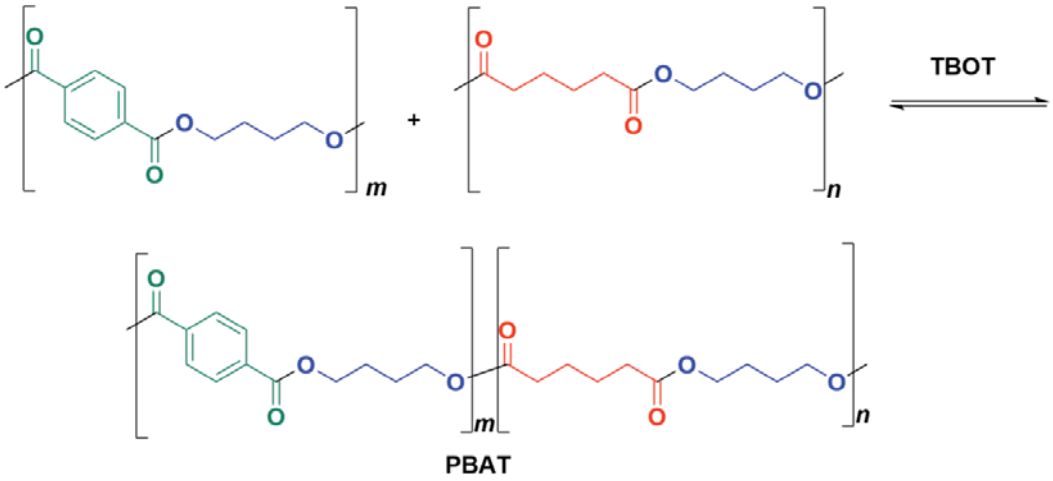
[23] Deroiné, M.; Le Duigou, A.; Corre, Y.-M.; Le Gac, P.-Y.; Davies, P.; César, G.; Bruzaud, S. *Polym. Test.* **2014**, *39*, 70.

De manera simultánea, se sintetiza el otro fragmento de poliéster a partir de 1,4-butanodiol y el TDM.



Esquema 5. Poliéster formado a partir de 1,4-butanodiol y DMT.

En último lugar, se produce la transesterificación catalizada por tetrabutoxititanio (TBOT) de los poliésteres de ácido adípico y DMT para generar el PBAT.

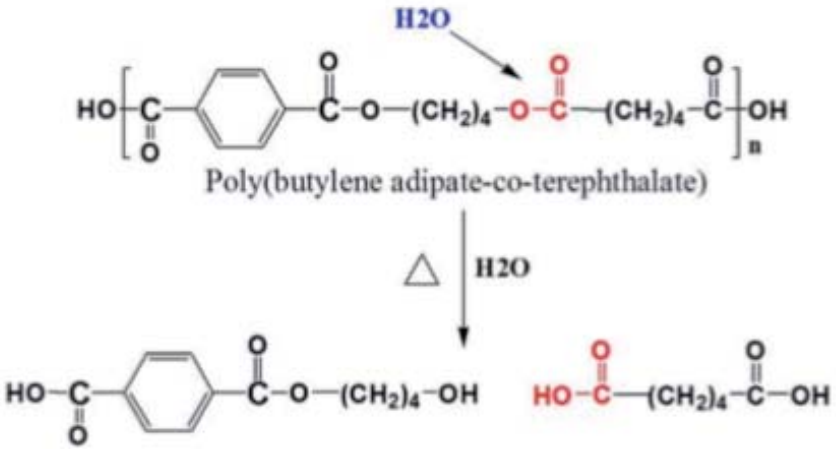


Esquema 6. Síntesis final del PBAT.

La hidrólisis del PBAT ha sido ampliamente estudiada quedando patente la mayor sensibilidad a una ruptura de los enlaces tipo éster por una elevada temperatura[24]. La escisión de las cadenas de PBAT en los grupos éster genera la aparición de grupos terminales carboxilo e hidroxilo[25]. Este hecho permite seguir el proceso de degradación del PBAT mediante espectroscopia de infrarrojo

[24] Kim, H.-S.; Kim, H.-J. *Polymer Degrad. Stab.* **2008**, *93*, 1544.

[25] Harris, A.M.; Lee, E.C. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *128*, 2136.



Esquema 7. Reacción de hidrólisis de un grupo éster del PBAT.

Objetivo 2.1: Modificación e incorporación de nuevos aditivos al PBAT para aumentar su capacidad de degradación

A continuación se relata el estudio de modificación de algunas características del film que contiene PBAT así como la incorporación de otros aditivos con el fin de cumplir los objetivos de este apartado.

2.1.1 Ángulos de contacto (mojabilidad)

La mojabilidad es un parámetro referido al ángulo que forma un líquido al entrar en contacto con una superficie. Depende principalmente de tres factores:

1. Composición de la superficie y del líquido.
2. Fuerzas que se establezcan entre ambos componentes.
3. Fuerzas cohesivas del líquido.

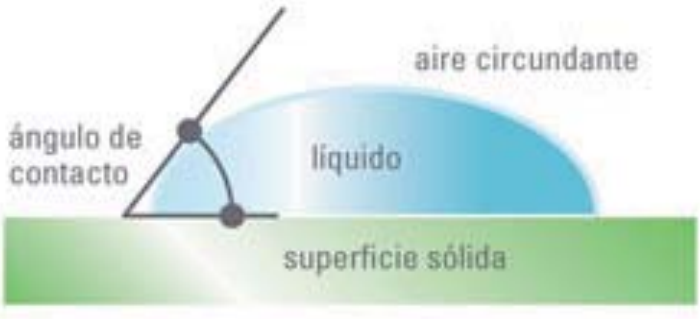


Figura 53. Representación del ángulo de contacto de una gota sobre una superficie sólida.

La mojabilidad de los films se basa en la interacción del líquido con la superficie y determina la calidad del film. Mide el grado de aceptación por parte del sólido de ser mojado por el líquido.

Imaginemos que el líquido objeto de estudio es el agua. Si la gota de agua es atraída fuertemente por la superficie sólida (superficie hidrófila), la gota se extenderá y el ángulo de contacto (φ) será aproximadamente cero (φ = 0) (Figura 6C). En estas condiciones se dice que hay una elevada mojabilidad. Por el contrario, si la superficie es hidrófoba, el ángulo de contacto es mayor de 90° (φ > 90°) y puede llegar incluso a valores próximos a 180° en el caso de superficies muy hidrófobas, como por ejemplo el teflón (Figura 6A) y se dice que existe una baja mojabilidad.

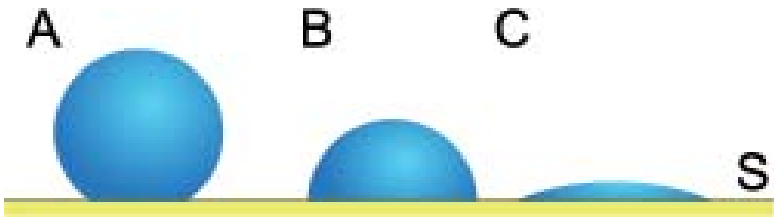


Figura 58. Representación del ángulo de contacto de una gota.

Un ejemplo de mojabilidad intermedia se daría con un valor del ángulo de contacto en torno a 77º (Figura 54).

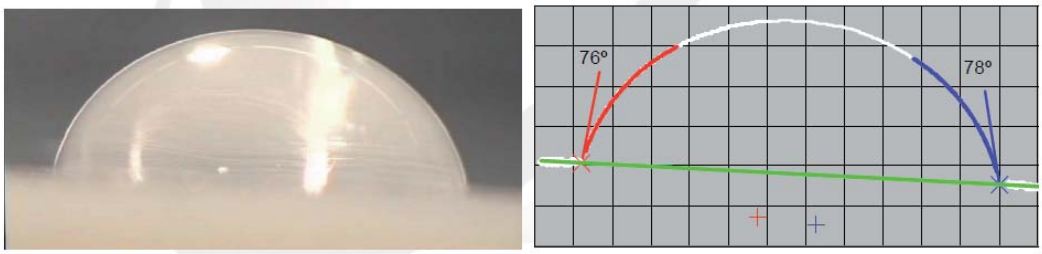


Figura 54. Ejemplo de mojabilidad intermedia (77º).

Para medir los ángulos de contacto de una gota de agua sobre las diferentes superficies estudiadas en este proyecto, se utilizó un aparato *Phoenix 300*.

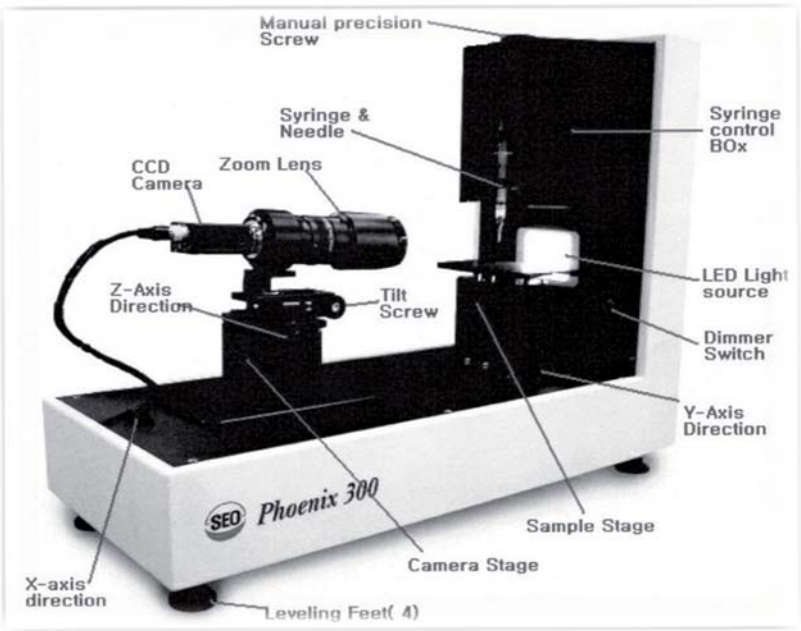


Figura 55. Aparto Phoenix 300 para medir el ángulo de contacto.

Este dispositivo posee una cámara instalada que es capaz de analizar el ángulo de contacto y la supervisión de la forma de gota. La adición del líquido sobre la superficie se realiza a través de una jeringa dosificadora, lo que permite la adaptación de su posición y el cambio rápido de líquido. Su configuración óptica facilita la medida de muestras grandes y un sistema de guía de luz elimina interferencias con la luz foránea. En último lugar, un software recoge la información para el cálculo de las medidas.

Con el fin de mejorar la mojabilidad de los film, y por consiguiente que haya una mejor interacción entre la superficie y el agua, se realizaron medidas del ángulo de contacto con agua para los films descritos en la siguiente tabla.

Tabla 15. Valores del ángulo de contacto obtenido para diferentes films.

		Agua		
FILM 40	**Ángulo**	34.17	32.12	33.58
	Izq.	35.69	31.94	34.56
	Der.	32.65	32.30	32.60
FILM 41	**Ángulo**	49.71	40.14	42.50
	Izq.	43.03	40.55	44.68
	Der.	56.41	39.74	42.50
FILM 43	**Ángulo**	32.30	35.23	28.58
	Izq.	33.58	35.91	27.41
	Der.	31.03	34.55	29.74
FILM 44	**Ángulo**	44.18	42.56	43.14
	Izq.	43.03	40.55	44.68
	Der.	56.41	39.74	42.50
FILM 45	**Ángulo**	32.28	38.88	38.34
	Izq.	33.12	37.37	38.14
	Der.	31.45	40.39	38.55

Un ejemplo del ángulo de contacto medido a una gota se puede observar en la imagen siguiente:

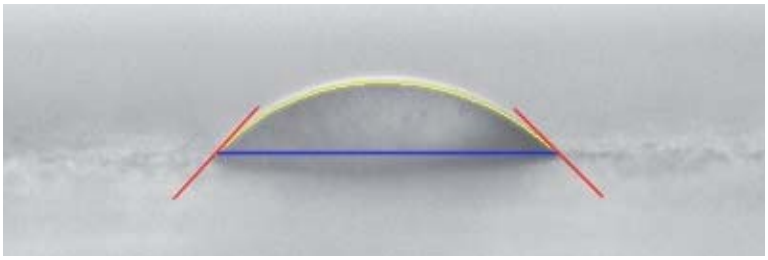


Figura 56. Gota de agua sobre la superficie de un film. En color amarillo el contorno, en azul la línea base y en rojo la tangente a la superficie.

En la siguiente tabla se muestran los valores medios del ángulo de contacto para cada tipo de film.

Tabla 16. Valores del ángulo de contacto medio obtenido para diferentes films.

		Film				
		40	**41**	**43**	**44**	**45**
Valor medio	**Ángulo**	33.29	44.12	32.04	43.29	36.50
	Izq.	34.06	42.75	32.30	42.75	36.21
	Der.	32.52	42.22	31.77	46.21	36.80

Si representamos gráficamente los valores obtenidos en la tabla anterior:

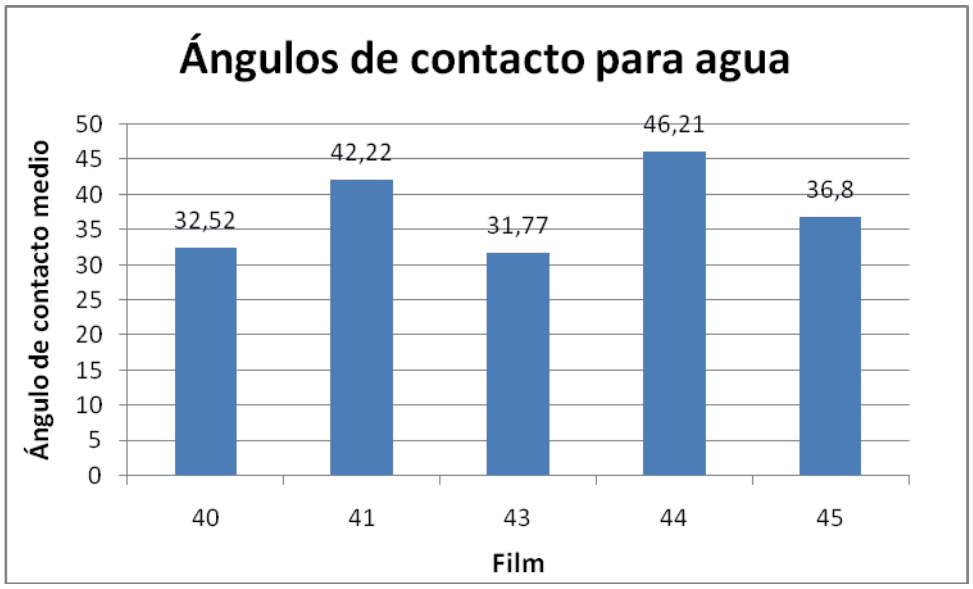


Figura 57. Gráfico con los valores medios del ángulo de contacto con agua de los films.

A partir de los datos obtenidos con anterioridad se puede observar como los valores de los film 41 y 44 son ligeramente superiores al del resto. Esto es debido a la presencia del cinamato como aditivo y a su carácter hidrofóbico.

Tabla 17. Valores del ángulo de contacto medio obtenido para diferentes films.

		5% Glicerina			10% Glicerina		
FILM 40	**Ángulo**	33.97	38.88	38.12	31.25	32.65	32.96
	Izq.	33.82	41.26	35.26	29.39	33.52	33.08
	Der.	34.13	36.50	41.16	33.11	31.78	32.84
FILM 41	**Ángulo**	47.90	47.44	47.69	53.82	58.00	56.28
	Izq.	46.74	45.96	48.25	52.79	59.18	55.17
	Der.	49.06	48.91	47.13	54.86	56.82	57.39
FILM 43	**Ángulo**	34.50	30.67	35.21	40.07	33.65	44.41
	Izq.	32.25	34.69	34.96	41.98	28.67	45.01
	Der.	36.74	26.66	35.48	38.19	38.19	43.81
FILM 45	**Ángulo**	48.21	48.33	42.30	45.21	46.13	47.86
	Izq.	46.11	50.57	44.99	43.76	45.91	50.57
	Der.	50.32	46.10	39.37	46.67	46.35	45.15

Con el fin comparar los valores obtenidos para cada tipo de film, se representa en la tabla siguiente el valor medio de los ángulos de contacto.

Tabla 18. Valores del ángulo de contacto medio obtenido para diferentes films.

		5% Glicerina				10% Glicerina			
		40	**41**	**43**	**45**	**40**	**41**	**43**	**45**
Valor medio	**Ángulo**	36.99	47.67	33.46	46.28	32.29	56.03	39.38	46.40
	Izq.	36.78	46.98	33.97	47.22	32.00	55.68	38.55	46.75
	Der.	37.20	48.36	32.96	45.26	32.58	56.36	40.06	45.06

Debido a los resultados negativos obtenidos con la glicerina, se propuso utilizar un alcohol de menor cadena, etanol, en las mismas proporciones, y ver si se observaba una

disminución del ángulo de contacto medio. Debido al comportamiento similar que se observará en los films al tratarse de un alcohol, únicamente se realizaron medidas para el film 45.

Tabla 19. Valores del ángulo de contacto medio obtenido para diferentes films.

		5% EtOH			10% EtOH		
FILM 45	**Ángulo**	30.31	29.35	28.74	29.92	24.63	27.15
	Izq.	31.07	30.69	29.53	30.50	23.48	27.07
	Der.	29.56	28.01	28.10	29.34	25.78	27.23

Tabla 20. Valores del ángulo de contacto medio obtenido para diferentes films.

		Film 45	
		5% EtOH	**10% EtOH**
Valor medio	**Ángulo**	29.47	27.23
	Izq.	30.43	27.02
	Der.	28.56	27.45

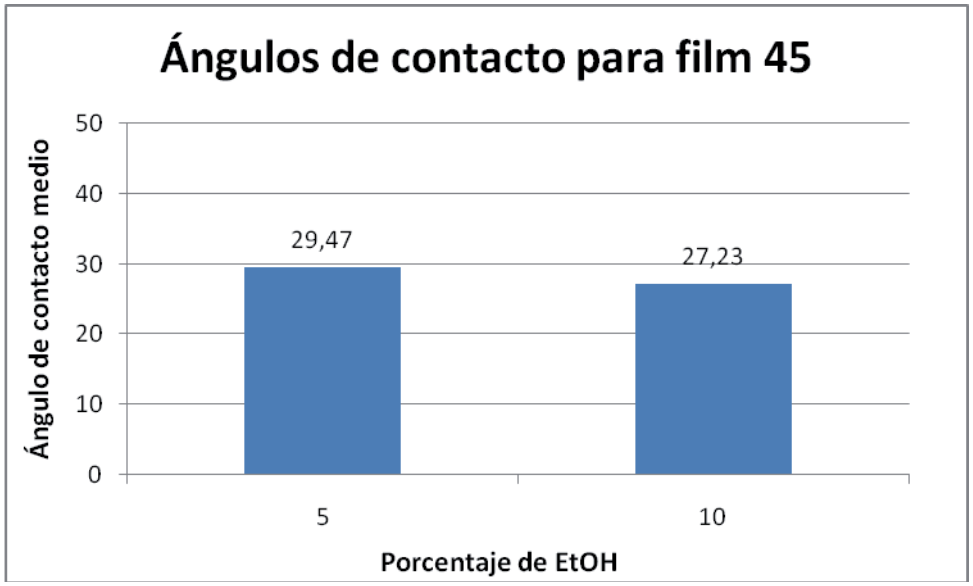


Figura 58. Gráfico con los valores medios del ángulo de contacto con etanol para el film 45.

Si comparamos gráficamente los valores de ángulo de contacto para el film 45 con etanol y glicerol:

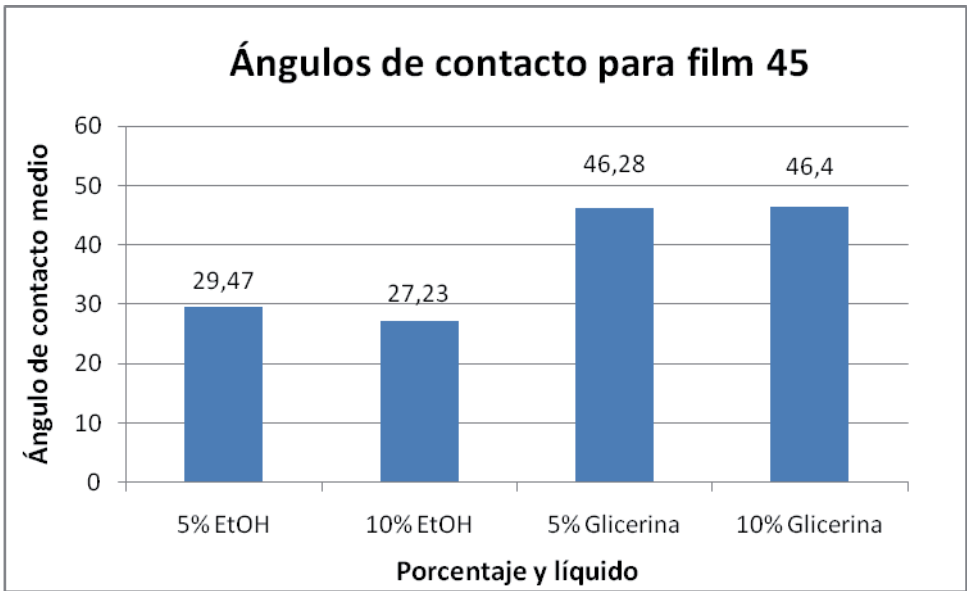


Figura 59. Gráfico con los valores medios del ángulo de contacto con etanol y glicerina para el film 45.

Por lo tanto, podemos obtener varias conclusiones a partir del gráfico anterior. En primer lugar, el ángulo de contacto es menor para el etanol que la glicerina, por lo que "moja" mejor al film. Por otra parte, la diferencia existente en el valor del ángulo de contacto entre el 5 y 10% de etanol es relativamente baja, por lo que es suficiente utilizar un 5% de etanol y a su vez, el ángulo de contacto es menor para el agua con etanol que sin el alcohol.

2.1.2 Espesor

Un parámetro importante a tener en cuenta a la hora diseñar los films para facilitar su degradación es el espesor de los mismos. Este parámetro influye en la velocidad de degradación del PBAT, ya que cuanto menor sea el espesor de los film producidos, mayor será la velocidad de degradación y, por consiguiente, menor tiempo.

Para realizar las medidas del espesor de capa en este proyecto se ha utilizado el medidor PCE-CT 25. Este aparato tecnológico permite medir el espesor de una capa situada sobre un material tanto férrico como no férrico, sin producir daño o modificación en el material. Es capaz de medir espesores de capa en un rango de 0 a 1000 μm, con un error despreciable a partir de 40 μm. La medida se produce a través de ultrasonidos.

Figura 60. Aparato de medido de espesor de capa PCE-CT 25

Para medir el espesor, es necesario realizar un calibrado del aparato en función del tipo de superficie en el que vayamos a realizar la medida (férrica o no férrica). Para ello se dispone de láminas de ambos materiales con un espesor determinado que permite el calibrado del aparato. Una vez realizado dicho calibrado, se sitúa sobre la superficie a medir y se aprieta el gatillo. El medidor devuelve el valor del espesor de capa en el display.

A continuación se muestran los diferentes valores de espesor obtenidos en los film 40 a 44 así como el valor medio de dicho espesor.

Tabla 21. Valores del espesor obtenido para los films 40 a 44.

	Valores			
FILM 40	183	201	206	178
	240	179	209	193
	235	209	195	169
FILM 41	88	75	85	97
	78	75	96	60
	83	89	86	92
FILM 43	52	54	52	61
	51	55	54	57
	54	57	58	59
FILM 44	65	66	68	67
	65	67	81	64
	67	66	68	67

Si calculamos el valor medio para cada film y representamos gráficamente dichos valores:

Tabla 22. Valor medio del espesor para los films 40 a 44.

Film	**40**	**41**	**43**	**44**
Espesor medio	200	84	55	66

Si representamos gráficamente los valores medios de espesor obtenidos para los distintos tipos de film:

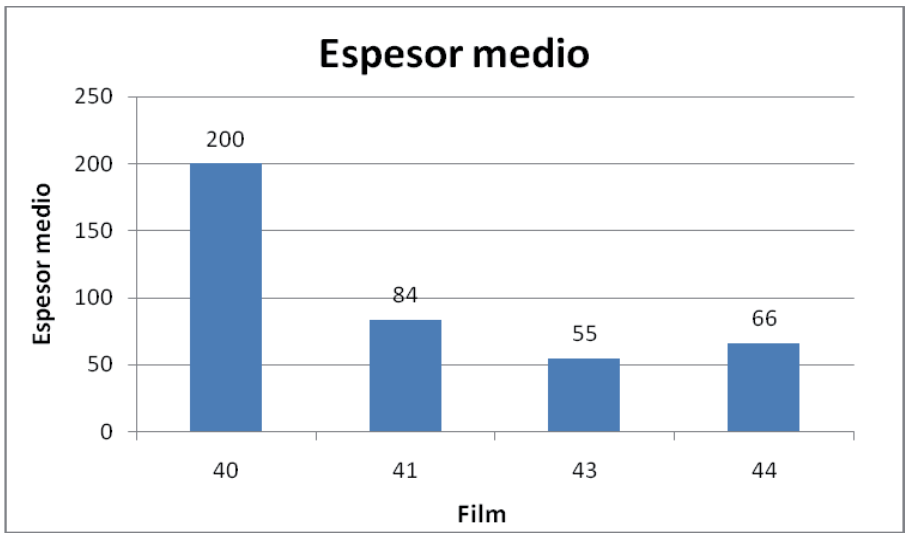


Figura 61. Gráfico con los valores medios del espesor para los films 40 a 44.

En la tabla anterior se puede observar como el espesor del film 40 es elevado con respecto al resto de films, que poseen espesores con valores comprendidos entre las 55 y 84 micras. Sin embargo, para disminuir el tiempo de degradación de dichos films se va a disminuir el espesor hasta las 40 micras o valores inferiores.

En los film que contienen un 2% de carbón, ya se observa la disminución del espesor de capa antes citada. A continuación se muestran los valores del espesor medido.

Tabla 23. Valores del espesor para los films 45 a 51.

	Valores			
FILM 45	53	47	47	48
	49	44	44	46
	50	48	46	47
FILM 46	42	33	44	45
	42	38	42	40
	37	43	41	41
FILM 47	35	30	24	30
	33	32	33	27
	32	31	33	29

FILM 48	33	35	35	40
	37	41	33	35
	43	37	39	40
FILM 49	27	26	24	26
	22	25	28	26
	25	26	25	25
FILM 50	19	23	20	25
	21	21	22	20
	19	20	21	21
FILM 51	17	13	17	15
	14	14	13	17
	14	15	16	17

Tabla 24. Valores del espesor medio para los films 45 a 51.

Film	45	46	47	48	49	50	51
Espesor medio	47	41	31	37	25	21	15

Si representamos gráficamente los valores medios de la tabla anterior:

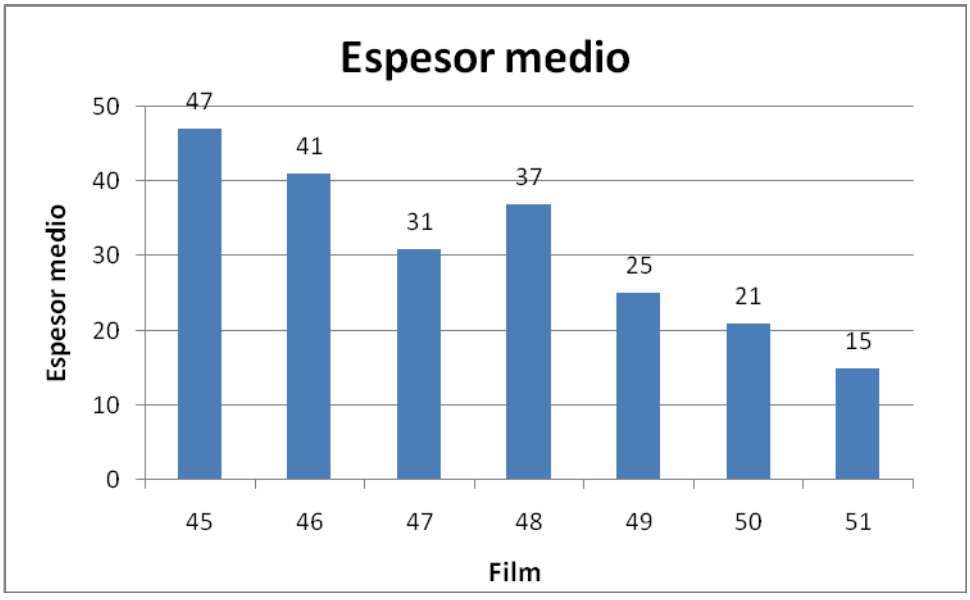


Figura 62. Gráfico con los valores medios del espesor para los films 45 a 51.

Como se puede observar, el espesor medio obtenido para los fllms 49, 50 y 51 se ecuentra entre las 15 y 25 micras , espesor óptimo para poder realizar las pruebas de degradación.

2.1.3 Sales inorgánicas

En este apartado se investiga la incorporación de sales inorgánicas micronizadas, que poseen elevada solubilidad en agua, a los films. La incorporación de sales inorgánicas al PBAT tiene un doble objetivo: en primer lugar una pérdida de peso como consecuencia de la disolución de las sales inorgánicas al entrar en contacto el film con el agua, y en segundo lugar la aparición de oquedades (y por consiguiente la modificación de las superficie plana) para obtener una mayor superficie activa y facilitar la acción de las enzimas.

Para ello se va a adicionar un 2% de diferentes sales al PBAT que tienen que cumplir una serie de condiciones: elevada solubilidad en agua y cuya disolución genere compuestos inocuos para el suelo.

En la tabla siguiente se muestran los film y la sal utilizada.

Tabla 25. Sales incorporadas a los films 46 a 48.

Film	46	47	48
Sal	KCl	KNO_3	NaCl

Sin embargo, la incorporación de estas sales a los films no se desarrolló adecuadamente al no tratarse de sales micronizadas y como consecuencia se obtuvieron films de textura granulosa.

Para facilitar la compatibilidad entre las sales y el PBAT se incorporó NaCl (referencia SigmaAldrich S-7653) y dihidrogenofosfato de sodio (referencia sigmaAldrich S-0751) previamente micronizadas en mortero de molienda en el SACE de la Universidad de Murcia y para su inclusión se utilizó un surfactante (Span 80).

Tabla 26. Sales micronizadas incorporadas a los films 49 y 50.

FILM	49	50
SAL	Fosfato	NaCl

En la imagen siguiente se puede observar la superficie a microscopía de 200 aumentos de dos tipos de film: 47 y 50. En la imagen representada con la letra a, correspondiente al film 47, se puede observar las partículas de la sal en la superficie, que han formado agregados de elevado tamaño. En lo que respecta al film 50,

representado con la letra b, se observa una buena dispersión de las partículas de sal micronizada.

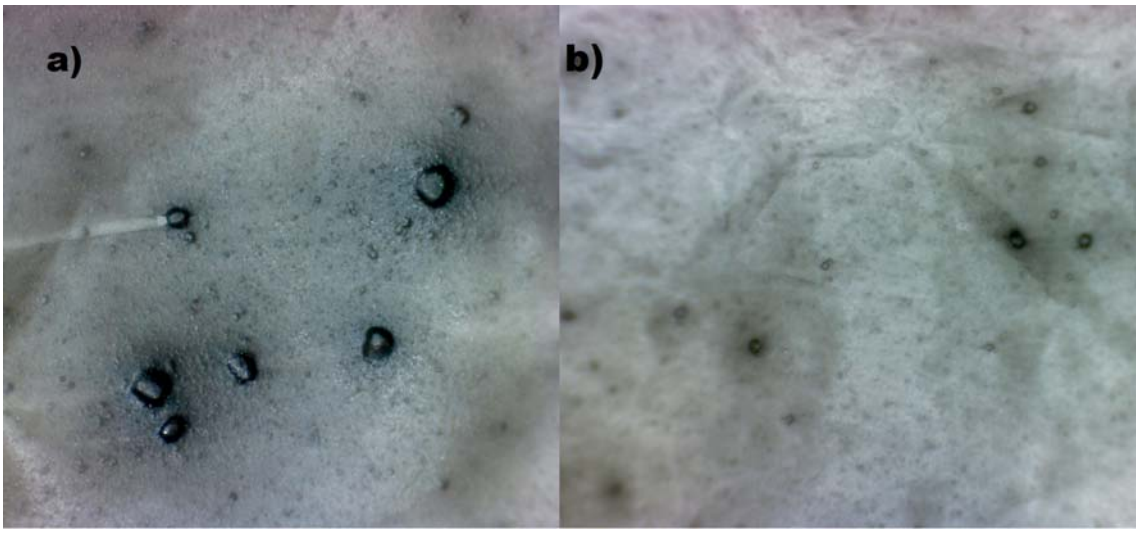


Figura 63. Imagen a microscopía de 200 aumentos de las superficies de los film a) 47 y b) 50

Una vez sumergidos los films en 20 mL de agua se dejaron durante 24 horas para facilitar la completa disolución de la sal y posteriormente se dejaron secar en un horno a 40ºC durante 5 horas para eliminar cualquier tipo de agua que pudiera alterar el porcentaje de pérdida de peso.

Tabla 27. Pérdida en peso de los films 46 a 50 en agua y mezcla etanol-agua.

Disolvente	Film	Peso Inicial	Peso final	Diferencia	% Pérdida
Agua	46	46.8	44.6	2.2	5
	47	53.3	50.3	3.0	6
	48	53.6	51.6	2.0	4
	49	10.4	9.8	0.6	6
	50	16.1	14.9	1.2	7
Agua + 5% EtOH	46	58.1	55.1	3.0	5
	47	34.6	32.5	2.1	6
	48	35.9	34.5	1.4	4
	49	11.1	10.4	0.7	6
	50	15.1	13.9	1.2	8

Como se puede observar en la tabla anterior, la pérdida de peso de las muestras ronda del 4 al 8%, valores muy superiores al porcentaje de sal que posee. Este hecho

puede explicarse en base a varios ensayos: el PEG 4000 es prácticamente soluble en agua (1.8% de un 2% del film es capaz de pasar a la fase acuosa), de un 7% del almidón que posee el film alrededor del 5% es capaz de solubilizarse en agua. Además, no existen diferencias significativas en la pérdida de peso de las muestras con y sin etanol.

La solubilidad de la sal fue completa y se pudo comprobar a partir de un microanálisis elemental de diferentes zonas del film que reveló la presencia de elementos como carbono y oxígeno, procedentes principalmente del PBAT, PLA, PEG y del almidón, silicio procedente de la sílice y calcio presente en el carbonato de calcio. Sin embargo, no se observaba elementos como sodio o fosfato presentes en las sales inorgánicas.

Con el fin de comprobar si se produce algún tipo de modificación en la superficie de los films al entrar en contacto con agua (o la mezcla agua-etanol) se realizaron imágenes a microscopio de barrido en el SACE.

A continuación se muestran dos imágenes correspondientes a los films sin sumergir en agua (a) y una vez sumergidos en agua (b).

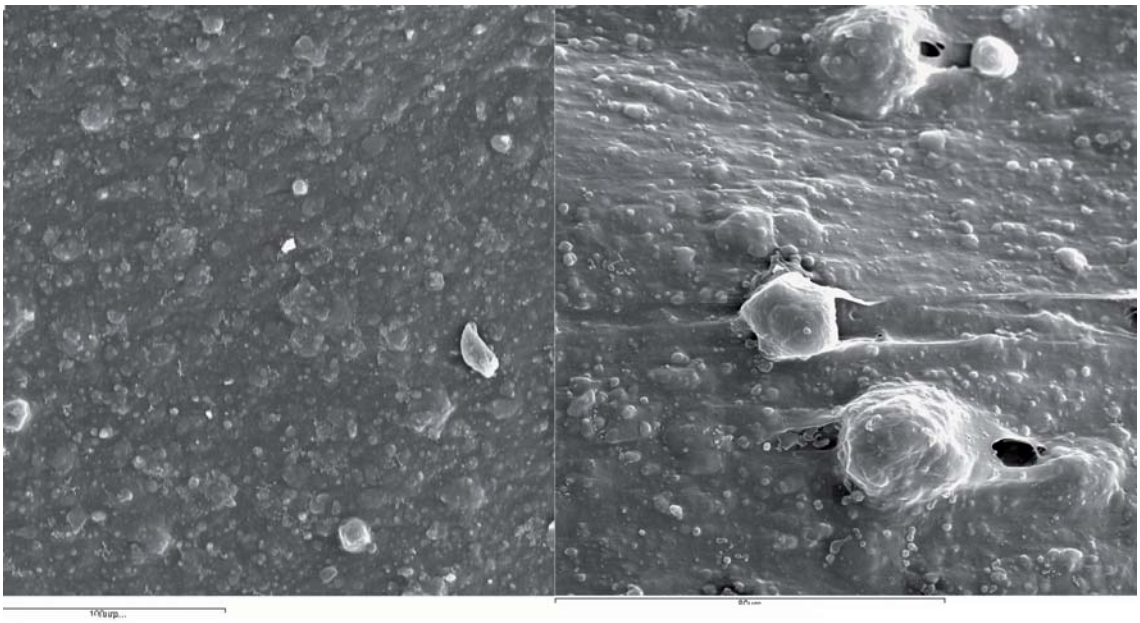


Figura 64. Imagen a microscopía de barrido del film 49 a) sin sumergir en agua y b) tras sumergir en agua.

Como se puede observar en la imagen anterior, la superficie del film una vez entra en contacto con el agua (o la mezcla agua-etanol) comienza a formarse pequeñas

oquedades como consecuencia de la disolución del PEG, las sales y el almidón. Además puede observarse como las partículas de almidón (que toman aspecto circular en la imagen) se hinchan como consecuencia del agua. En la imagen siguiente puede observarse con mayor claridad el proceso citado.

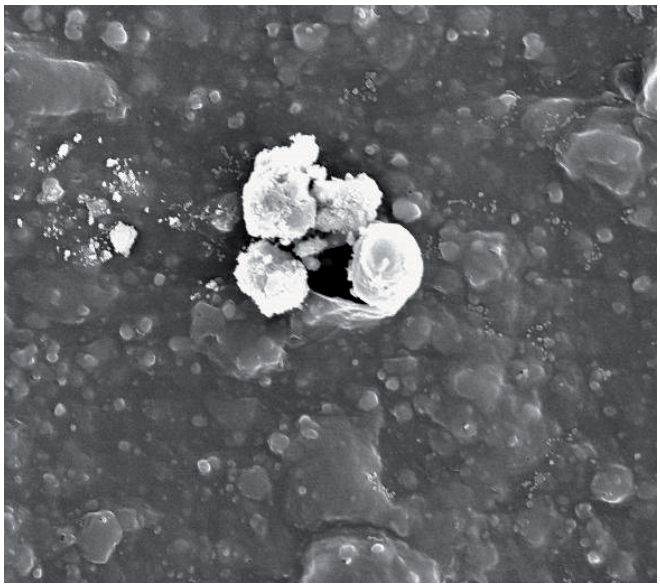


Figura 65. Imagen a microscopía de barrido del film 49.

A continuación podemos observar una imagen de la superficie del film 50 tras estar en contacto con agua.

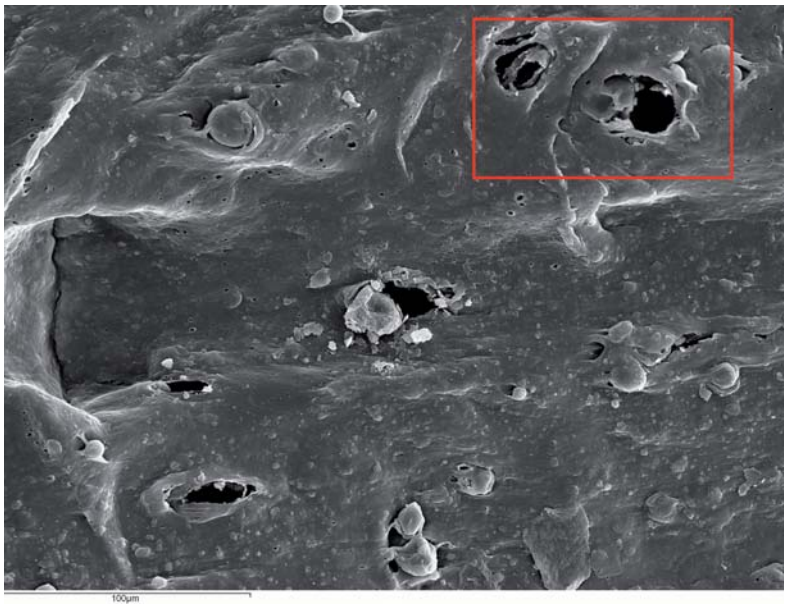


Figura 66. Imagen a microscopía de barrido del film 50.

En la imagen se puede observar numerosas oquedades formadas por el sumergimiento del film en agua y el paso a la fase acuosa de las sales inorgánicas que estaban presentes en el mismo.

Si realizamos una ampliación de la zona delimitada por el rectángulo rojo en la figura anterior:

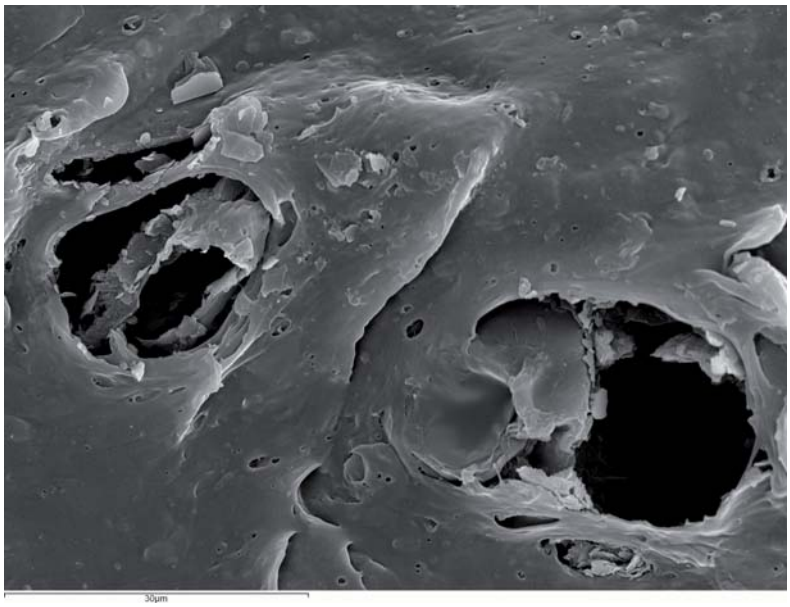


Figura 67. Imagen ampliada de la zona delimitada en rojo de la figura 67.

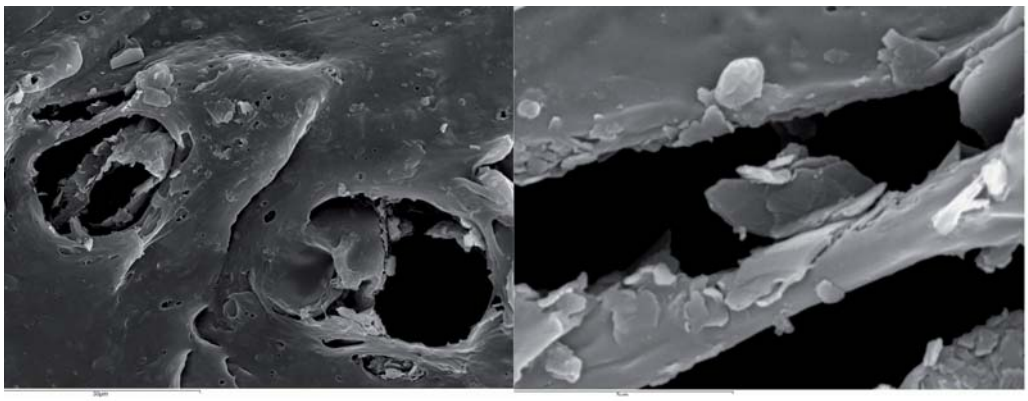


Figura 73. Imagen ampliada de la oquedad a 12000 aumentos.

2.1.4 Sorbitol

El sorbitol es un polialcohol ampliamente utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica o textil debido a su no toxicidad y a su bajo coste al tratarse de un producto principal de la fotosíntesis de las plantas, junto con la sacarosa o el almidón.

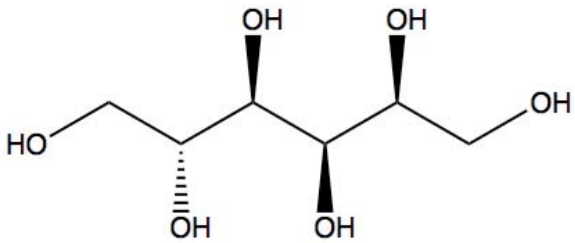


Figura 68. Estructura química del D-sorbitol.

La inclusión de sorbitol como aditivo al PBAT es debido a la mejor compatibilidad que presentará con el film resultante, que provocará una mejora en las propiedades mecánicas del mismo. Además, al tratarse de un producto higroscópico, mejorará la humectancia del film que facilitará, como se ha citado con anterioridad, la actividad enzimática.

El film resultante de la incorporación de un 2% de sorbitol como aditivo posee un incremento considerable en las propiedades mecánicas con respecto a los anteriores.

Tabla 28. Pérdida en peso del film 51 en agua y mezcla etanol-agua.

Disolvente	Film	Peso Inicial	Peso final	Diferencia	% Pérdida
Agua	51	18.4	17.6	0.8	5
Agua + EtOH	51	18.8	17.7	1.1	6

Un estudio de la superficie mediante microscopía electrónica de barrido del film 52 reveló hechos similares que en el caso de los films 49 y 50, en el que se observa una superficie lisa.

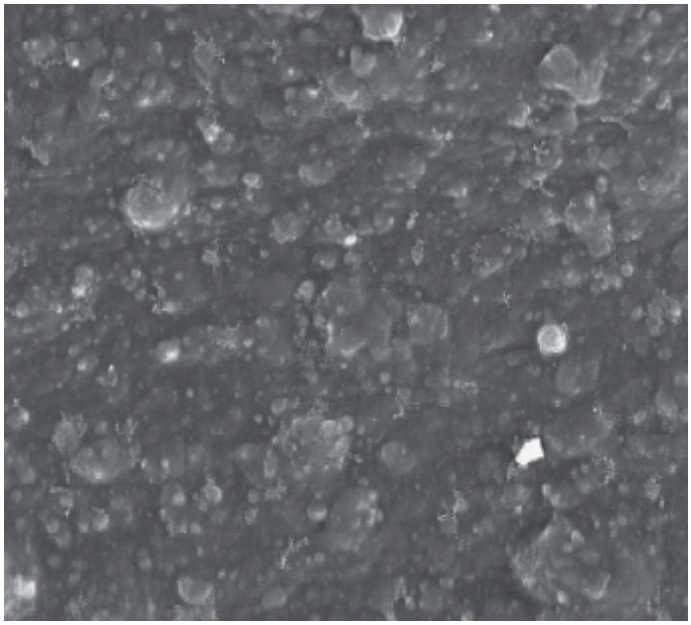


Figura 69. Superficie del film 52 a 400 aumentos.

El posterior sumergimiento del film en agua, realizando el mismo procedimiento que en el apartado anterior para los films que contenían las sales inorgánicas, generó la presencia de oquedades en la superficie del film.

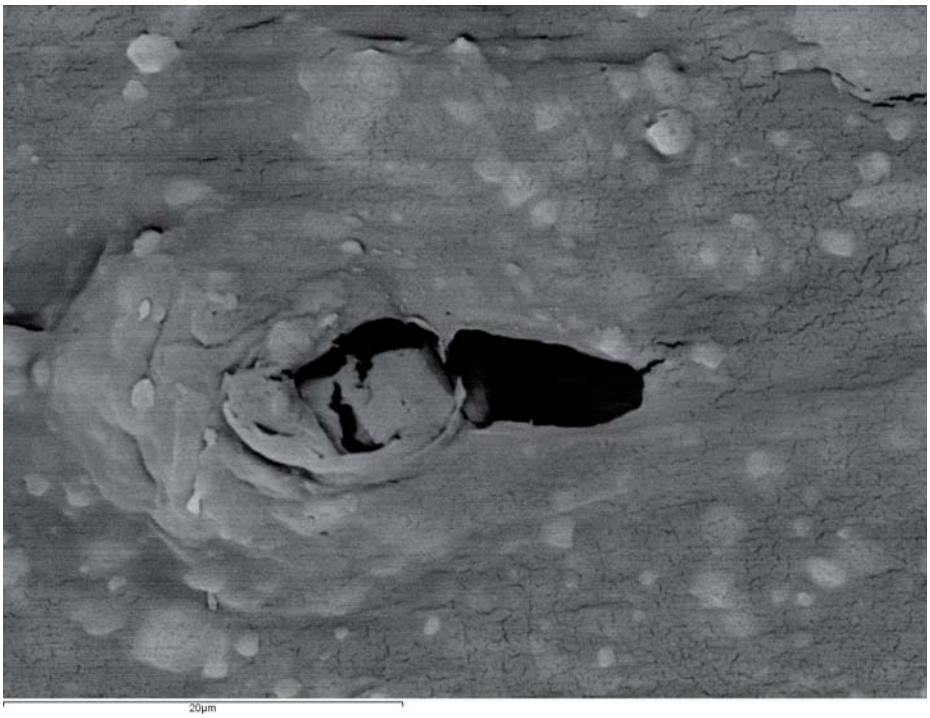


Figura 70. Oquedad observada en la superficie del film 52 a 6000 aumentos.

Objetivo 2.2: Investigación y obtención de nuevas formulaciones de PBAT y PLA con encapsulación de enzimas proteinasa K, α-amilasa y Lipasa B.

2.2.1 Investigación de la actividad de α-amilasa

Al inicio de esta memoria se ha estudiado la incorporación de almidón como aditivo de carga al PLA y al PBAT debido a su bajo coste, al incremento de la absorción de agua que provoca y las buenas propiedades mecánicas del film resultante.

El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de amilosa y amilopectina en proporción variable dependiendo del organismo de procedencia.

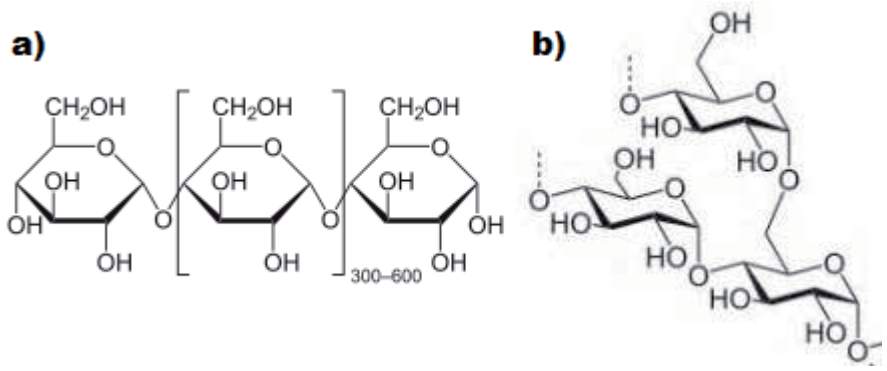


Figura 71. Estructuras químicas de a) amilosa y b) amilopectina.

La enzima α-amilasa es capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos α–(1→4) presentes en la amilosa y los α–(1→4) y α–(1→6) de la amilopectina, liberando al medio glucosa. Es por ello que la aplicación de algún método de determinación de glucosa presente en el medio nos permitirá conocer la posible actividad de la enzima en diferentes condiciones y medios.

En la estructura tridimensional de la enzima cabe destacar la presencia de un ión calcio (de color amarillo) próximo al centro catalítico y un ión cloruro (color verde)[26].

[26] Ramasubbu, N.; Paloth, V.; Luo, Y.; Brayer, G.D.; Levine, M.J. *Biological Cristallography*, **1996**, *52*, 435.

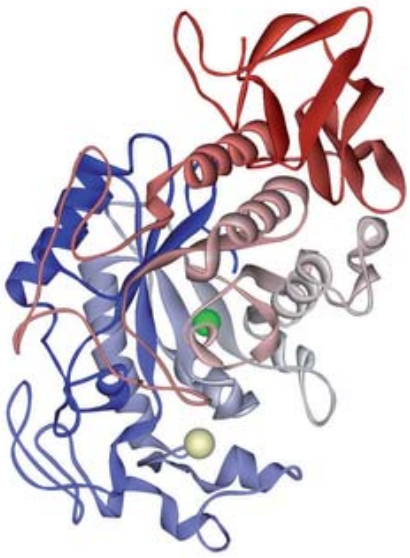


Figura 72. Estructura tridimensional de la α-amilasa.

Un método válido para la determinación de azúcares reductores es el desarrollado por Summer y sus colaboradores con el uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)[27]. Este método espectrofotométrico, que ha sufrido diferentes variaciones a lo largo del tiempo en función de la composición de la matriz donde radiquen dichos azúcares, posee una elevada sensibilidad por lo que es ampliamente utilizado.

Este método consiste en la reducción del grupo nitro en la posición 3 del anillo de benceno a amina, y por consiguiente la oxidación del aldehído de la glucosa a ácido carboxílico.

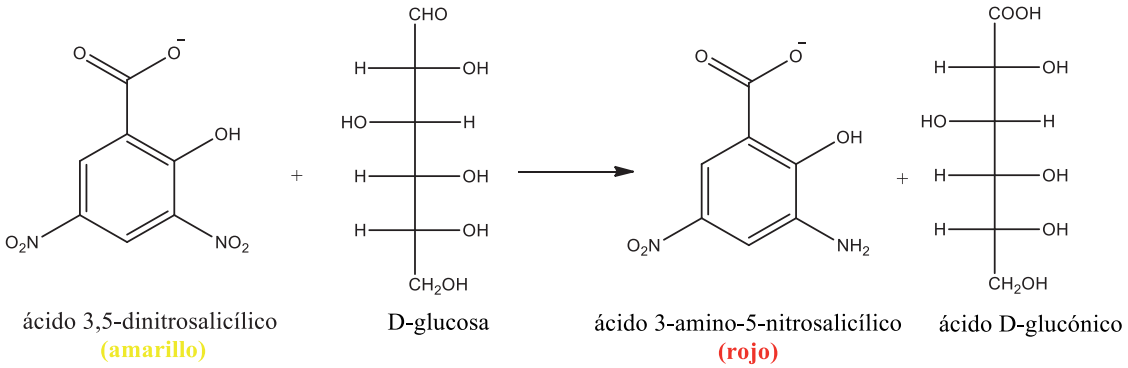


Figura 73. Reacción de oxidación de la glucosa con DNS.

[27] "Determinación de azúcares reductores", Summer, **1921**.

Para la preparación del reactivo es necesario disolver 0.8 gramos de NaOH en 40 mL de agua y se adiciona, bajo agitación y lentamente, 15 gramos de tartrato de Na-K. Pasados 15 minutos, se adiciona de igual manera bajo agitación y lentamente 0.5 gramos del ácido 3,5-dinitrosalicílico y se deja en agitación durante 12 horas. Finalizado este tiempo, se enrasa a 50 mL para obtener una concentración final de DNS de 50 mM[28].

Para la calibración del método se prepararon una serie de disoluciones de glucosa a partir de una disolución de partida 80 mM de glucosa mediante adición de agua destilada.

Tabla 29. Disoluciones para la calibración del método.

$V_{[glucosa]}$ (mL)	V_{agua} (mL)	[Glucosa] (mM)
0,00	5.00	0
0.25	4.75	4
0.50	4.50	8
0.75	4.25	12
1.00	4.00	16
1.25	3.75	20
2.50	2.50	40
3.75	1.25	60
5.00	0.00	80

Se tomaron 0.5 mL de las disoluciones anteriores a las que se les adicionó 0.5 mL de la disolución de DNS. Una vez añadido, se agita y se colocan en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se enfrían rápidamente en un baño con hielo y se procede a la medida espectrofotométrica.

Las absorbancias a partir de las concentraciones finales de la glucosa se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 30. Medidas de absorbancia para la recta de calibrado del método DNS.

[Glucosa] (mM)	0	2	4	6	8	10	20	30	40
Absorbancia	0,00	0,04	0,11	0,17	0,24	0,31	0,58	0,85	1.12

[28] Coughlan, M.P.; Moloney, A.P. *Meth Enzymol.* **1988**, *35*, 605.

Representando gráficamente la absorbancia medida frente a cada concentración de glucosa obtenemos la siguiente gráfica:

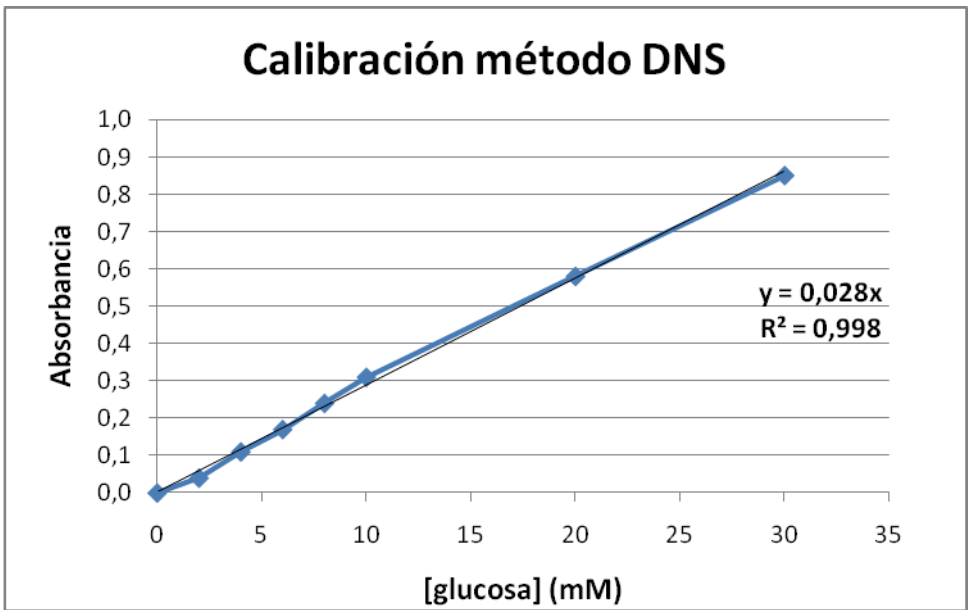


Figura 74. Gráfica de calibración de glucosa mediante el método DNS.

La ecuación de Lambert-Beer nos indica que la representación grafica de la absorbancia (eje ordenadas) frente a la concentración (eje abcisas) es una línea recta cuya pendiente es el producto del coeficiente de extinción molar y el recorrido óptico del haz de luz que viene dado por la longitud de la cubeta.

$$A = \varepsilon bc$$

Ecuación 4. Ley de Lambert-Beer

Donde:

A = absorbancia

ε= coeficiente de extinción molar

b= longitud de la cubeta

c= concentración

Por lo tanto, a partir de la gráfica anterior podemos calcular el coeficiente de extinción molar que coincide con el valor de la pendiente ya que el valor del camino óptico (b) es de 1 cm.

$$\varepsilon = 0.028\ mM^{-1}cm^{-1} = 28\ M^{-1}cm^{-1}$$

Con el fin de comprobar si existía acción de la enzima se investigó la actividad de la misma mediante un doble ensayo: un film que la contuviera en su interior previamente al proceso de extrusión un ensayo sumergiéndolo en una disolución 10 mg/mL de almidón durante 24 horas y otro únicamente en agua, con el fin de comprobar si era capaz de actuar con el almidón que posee en su interior el plástico.

En primer lugar, se realizó el ensayo del film que contiene a la α-amilasa en su interior y se sumergió en una disolución de 1 mg/mL de almidón. Tras 24 horas se obtuvo un valor de absorbancia de 0.131 unidades. Si introducimos este dato en la recta de calibrado anterior, podemos obtener la concentración de glucosa presente en la disolución.

$$y = 0.028x \rightarrow x = y/0.028 = 0.141/0.028 \rightarrow \boxed{x = 5.04\ mM}$$

La concentración total de glucosa que debería encontrarse en el medio suponiendo una hidrólisis del almidón del 100% es de 5.55 mM, por lo que el rendimiento de la enzima es la división entre ambas concentraciones, aportando un valor del 91%.

$$\frac{5{,}04}{5{,}55} \cdot 100 = 91\%$$

Una vez comprobado que la enzima posee actividad una vez se ha llevado a cabo el proceso de extrusión y no se ha producido su desactivación, se realizó un segundo ensayo que consistía en la inclusión de un film que posee la enzima absorbida en almidón liofilizado. Tras una semana desde su formación, se sumergió una probeta del film de tamaño 10x1 cm en 20 mL de agua durante 24 horas con el fin de detectar glucosa en el medio acuoso como consecuencia de la degradación del almidón por la enzima. Pasado este tiempo, no se observó actividad alguna. Debido a este hecho, se dejó una semana más el film y se volvió a repetir el proceso, obteniendo esta vez un

valor 0.023 de absorbancia. Si introducimos este dato en la recta de calibrado anterior, podemos obtener la concentración de glucosa presente en el medio.

$$y = 0.028x \rightarrow x = y/0.028 = 0.023/0.028 \rightarrow \boxed{x = 0.82 \text{ mM}}$$

A partir de la molaridad obtenida, podemos calcular los miligramos de glucosa presente en la fase acuosa, conociendo el peso molecular de la glucosa (180 g/mol) y el volumen de disolución (20 mL):

$$M = \frac{n}{V} = \frac{g}{Pm \cdot V}$$

Ecuación 5. Ecuación de molaridad

Si despejamos los gramos de la ecuación:

$$g = M \,.\, V \,.\, Pm$$

Ecuación 6. Obtención de los gramos.

$$g = 0.00082x0.02x180 = 4.76\, mg$$

El peso de la probeta es de 78.3 mg por lo que si s suponemos que se ha producido una distribución uniforme del almidón en todo el film en el proceso de extrusión, un 7% del peso de la probeta corresponderá al polisacárido:

7% de 78.3 mg = 5.48 mg de almidón

Aplicando la ley de conservación de la masa de Lavoisier para las reacciones químicas, al producirse la hidrólisis del almidón a glucosa como único producto, el 100% de la masa del almidón se convertiría en el azúcar cuyo peso molecular se ve aumentado insignificantemente al tratarse de grandes cadenas de unidades repetitivas. Por ello, una aproximación es considerar que se obtendría 5.48 mg de glucosa y por lo tanto el porcentaje de almidón hidrolizado es de:

$$\frac{4{,}76}{5{,}48} \cdot 100 = 87\%$$

Este rendimiento pone de manifiesto que la enzima es capaz de hidrolizar parte del almidón previamente en el film debido a que la solubilidad del almidón en el agua es de

un 78% por lo que no es posible que haya podido pasar completamente a la fase acuosa y posteriormente que la enzima lo degrade.

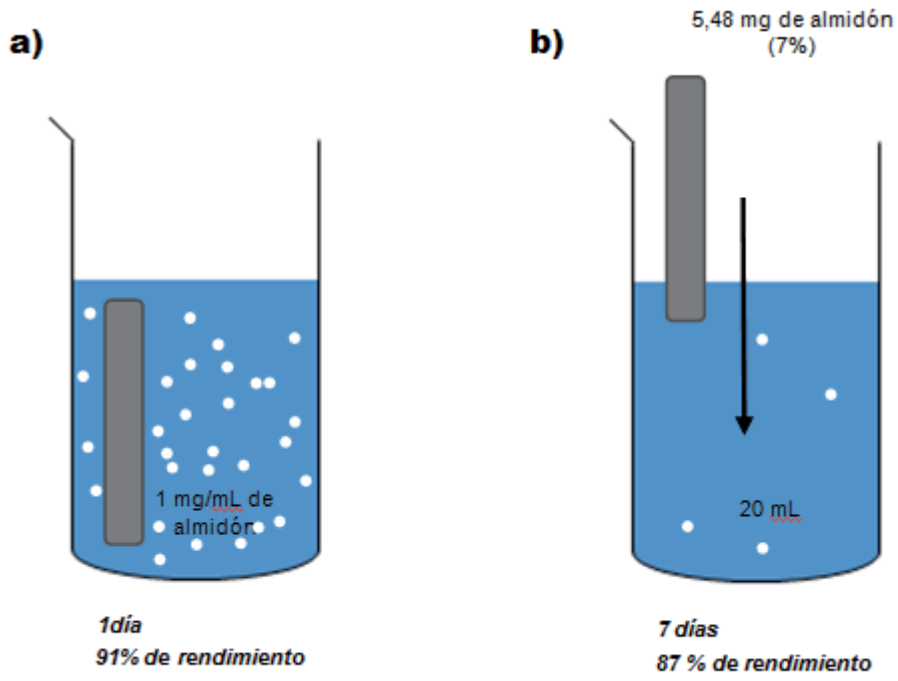


Figura 75. En la figura a) proceso descrito con la enzima actuando sobre la disolución de almidón y b) la enzima actúa previamente en el almidón presente en el film.

En ambos casos, se obtienen resultados positivos y en periodos de tiempo breves, por lo que hace posible incorporar ambos procesos como métodos para la degradación efectiva de almidón.

2.2.2 Investigación y encapsulación de proteinasa K, lipasa B y α-amilasa sobre cinamatos e incorporación al PBAT.

En el apartado 1.2.3 se ha citado el proceso de adsorción de proteinasa K sobre cinamatos, obteniéndose al cabo de una hora el máximo de adsorción de ésta sobre el soporte.

En lo que respecta a la adsorción de α-amilasa y lipasa B sobre cinamato de sorbitol, se procedió a repetir el mismo procedimiento, adicionando 200 mg de del cinamato sobre disoluciones de ambas enzimas 50 mM y se midió la absorbancia obtenida al reaccionar el cinamato con una disolución de pNA 50 mM en el caso de la lipasa B y según el método DNS para la amilasa, a distintos tiempos con el fin de comprobar el tiempo necesario para obtener la mayor concentración de la enzima adsorbida.

Tabla 31. Medidas de absorbancia para la adsorción de α-amilasa y lipasa B sobre cinamatos a distintos tiempos.

Enzima					
α-amilasa	Tiempo (h)	1	2	3	4
	Absorbancia	0.096	0.127	0.129	0.132
Lipasa B	Tiempo (h)	1	2	3	4
	Abosrbancia	0.132	0.156	0.158	0.158

Tal y como se puede observar en las absorbancias para la α-amilasa, a pesar de existir un aumento en la absorbancia a las 3 y 4 horas, dicho aumento no es significativo, por lo que el tiempo óptimo para la inmovilización de la enzima sobre el soporte de cinamato es de dos horas. Este hecho mismo hecho se observa en el caso de la lipasa B, en el que dos horas es suficiente para producirse la inmovilización de la enzima.

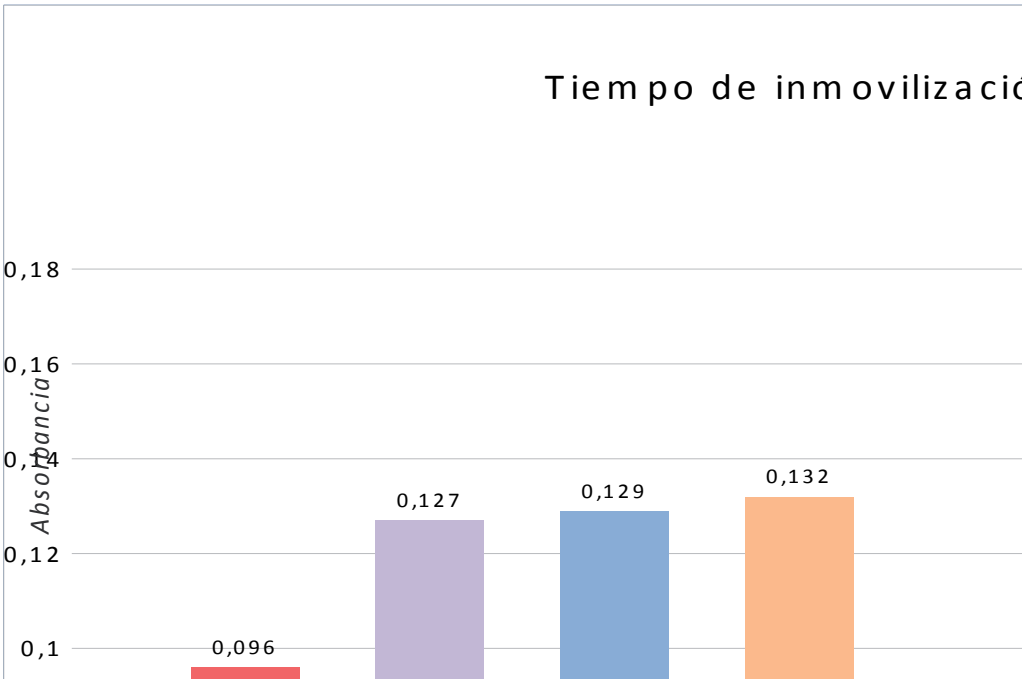


Figura 76. Gráfica de calibración para el método DNS.

El proceso de adsorción de las enzimas en el cinamato de sorbitol también se observa al sumergir directamente un film que contenga como aditivo dicho cinamato en la disolución de la respectiva enzima. Para ello se sumergió un film que contenía un 1% de cinamato como aditivo, sobre una disolución de amilasa (100 μg/ml) durante 4 horas. Una vez pasado este tiempo, se lavó el film con una disolución tampón fosfato y se estudió la actividad de la enzima sumergiendo el film en una disolución con una concentración de almidón 10 mg/ml durante 1, 4, 12 y 24 horas.

Tabla 32. Medidas de absorbancia para la adsorción de α-amilasa sobre cinamato incorporado como aditivo al film.

α-amilasa	Tiempo (h)	1	4	12	24
	Abosrbancia	0.000	0.059	0.175	0.459

Este ensayo demuestra que se puede producir la adsorción de la enzima sobre el cinamato cuando éste se encuentra presente en el film.

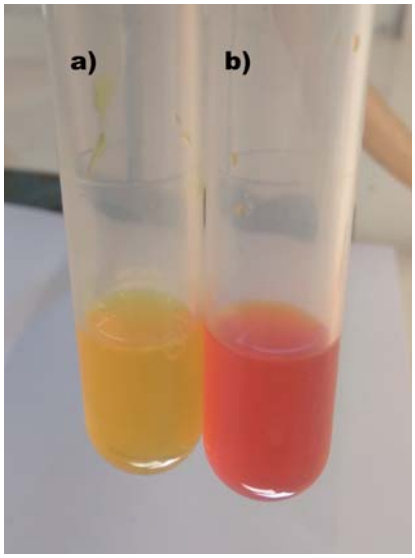


Figura 77. Disoluciones de a) blanco de DNS y b) una vez sumergido el film durante 24 horas en almidón y realizado el método DNS.

Por lo tanto, es posible modular la inmovilización de la enzima sobre el cinamato de sorbitol antes o después del proceso de extrusión del film, dependiendo de las condiciones.

2.2.3 Investigación de la biodegradación de films de PBAT-PLA en disoluciones de proteinasa K, a-amilasa y lipasa B

En primer lugar es necesario establecer una serie de parámetros, como la disolución tampón en la que se encontrarían las enzimas y la temperatura de trabajo, ya que ambos parámetros, en especial ésta última, influyen directamente en la actividad enzimática de las tres enzimas.

Tabla 33. Revisión bibliográfica de temperaturas, pH y disoluciones tampón utilizadas para cada una de las enzimas.

Enzima	Rango de T (ºC)	Temperatura óptima (ºC)	pH	Tampón
Proteinasa K[29]	20 - 60	37	7.0 – 12.0	Tris-HCl 0.1M
Lipasa B[30]	30 - 50	37	7.0 - 9.0	Fosfato de sodio
α–amilasa[31]	30 - 50	35	6.0 - 7.4	Fosfato de sodio

En la tabla 33 se puede observar los rangos de temperatura de las tres enzimas así como la temperatura óptima en la que poseen el máximo de actividad enzimática. La proteinasa K puede actuar en un rango de temperatura entre 20 y 60 ºC, mientras que las enzimas lipasa B y α-amilasa entre 30 y 50ºC. La temperatura óptima seleccionada para este objetivo será 37ºC.

En lo que respecta al pH y la disolución tampón, se seleccionó una disolución de tampón fosfato de pH=7.4 ya que se encuentra en el rango de actuación de las tres enzimas.

29 Bajorath, J.; Saenger, W.; de Pada, G.P. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1988**, *954*, 176.

30 Balçao, V.M.; Paiva, A.L.; Malceta, F.X. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 392.

31 Cox, M.M.; Nelson, D.L. *Lehninger*, Principios de Bioquímica, Barcelona, **2006**, Ed. Omega.

Tabla 34. Condiciones de trabajo seleccionadas para la degradación del PBAT-PLA.

Temperatura óptima de trabajo (ºC)	pH	Disolución tampón
37	7.4	Fosfato de sodio

Se recortaron probetas de 10x1 cm de ancho de diferentes tipos film que se unieron por los extremos formando anillas. Este proceso es debido a que, al encontrarse en esa forma, se favorece el ataque de las enzimas por todas las caras del film. Estas probetas se sumergieron en dos tipos diferentes de disoluciones, una que contenía las tres enzimas con el fin de observar la acción de degradación conjunta de las tres y por otro lado únicamente enzima lipasa B.

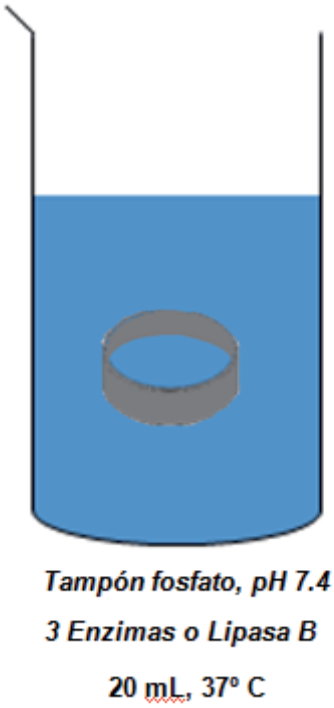


Figura 78. Ensayos realizados para diferentes tipos de film con las tres enzimas o únicamente con la enzima lipasa B.

Los films seleccionados para el estudio de biodegradación se pueden observar en la siguiente tabla así como la composición característica de cada uno de ellos:

Tabla 35. Films y su composición seleccionados para el desarrollo de este objetivo.

Film	Composición
41	6% almidón 2% PEG 4000 3% PEG 10000 1% enzima cinamato Lipasa B
45	6% almidón 2% PEG 4000 3% PEG 10000
49	7% almidón 2% PEG 4000 3% PEG 10000 2% Fosfato
50	7% almidón 2% PEG 4000 3% PEG 10000 2% NaCl
51	7% almidón 2% PEG 4000 3% PEG 10000 2% Sorbitol

Estos films, como se ha citado en los apartados 2.1.3 y 2.1.4 se sumergieron inicialmente en agua para favorecer la pérdida parcial de almidón y de las sales inorgánicas en el caso de los film 49 y 50 y del sorbitol para el film 51. Del mismo modo que se argumentó en dichos apartados, este proceso provoca la formación de oquedades que generarán un aumento significativo de la superficie del film y como consecuencia un incremento exponencial de la velocidad enzimática de las enzimas.

Tras 15 días en las condiciones descritas, no se observaba ningún cambio físico en los films que bañados con la disolución de la enzima lipasa B. Sin embargo, en aquellos films que se encontraban sumergidos en la disolución de las tres enzimas había aparecido una suspensión que se trata de una mezcla de glucosa procedente de la hidrólisis del almidón, monómeros de PLA y PBAT y aminoácidos de las enzimas.

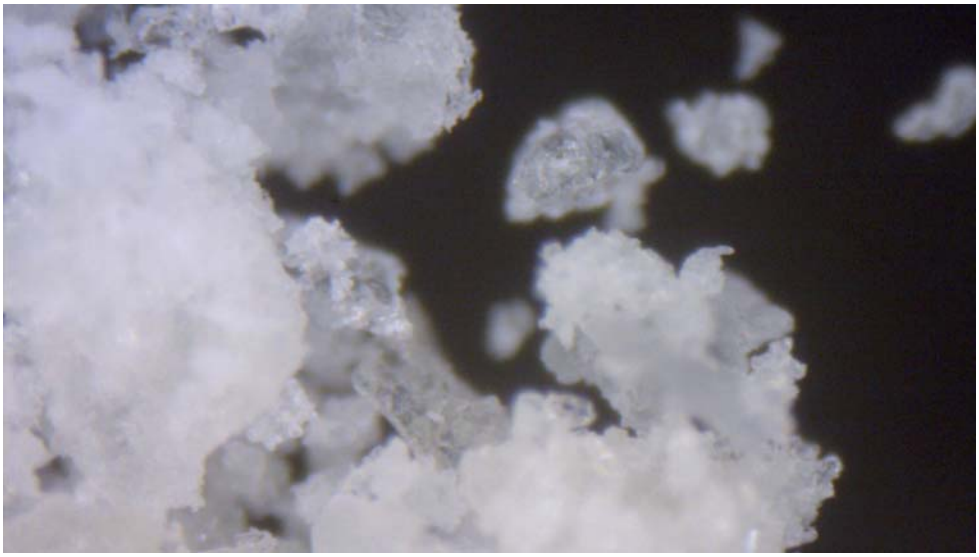


Figura 79. Suspensión a microscopía de 600 aumentos presente en la disolución con las tres enzimas del film 49.

Para finalizar el estudio de la superficie mediante microscopía electrónica de barrido se realizó un "mapping". Este proceso permite obtener la distribución de los diferentes elementos presentes en la superficie del film.

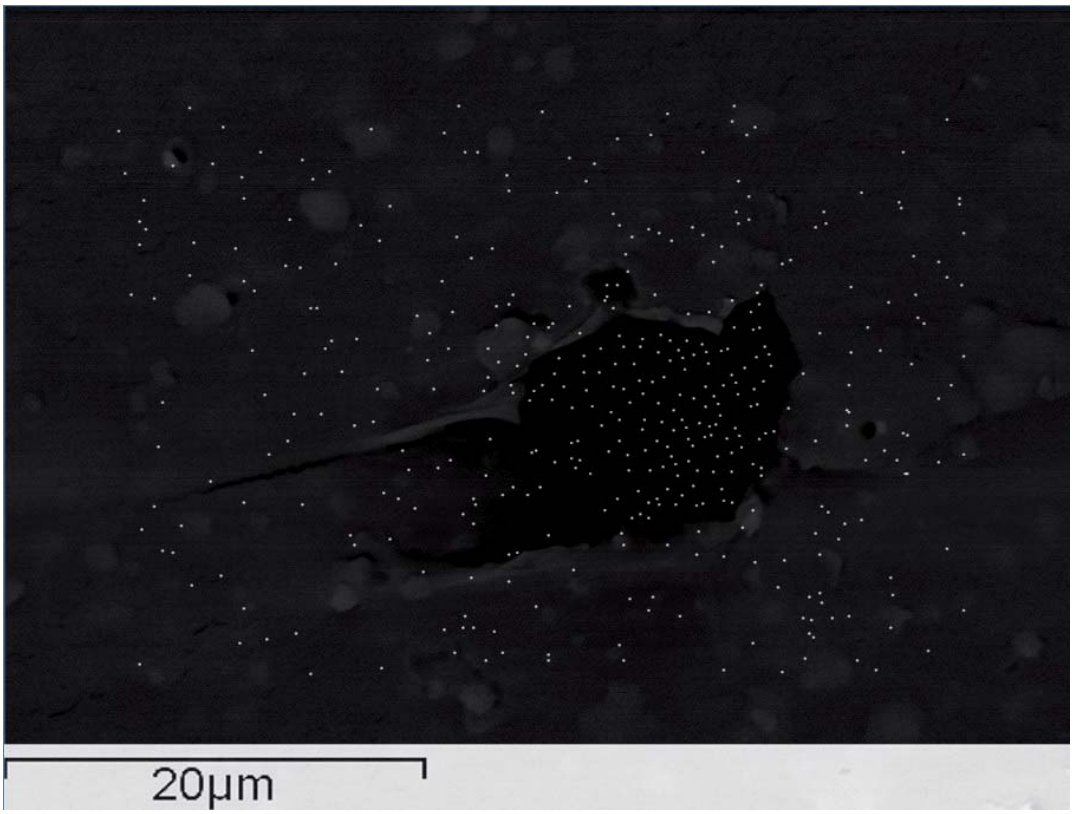


Figura 80. Mapping de oxígeno de una zona de la superficie del film 50.

Como se puede observar en la imagen, existe una mayor distribución de átomos de oxígeno en la zona de la oquedad, lo que indicaría una mayor degradación de dicha zona.

Como se puede observar en la imagen, existe una mayor distribución de átomos de oxígeno en la zona de la oquedad. Este hecho pone de manifiesto una mayor degradación de dicha zona como consecuencia de la ruptura de los enlaces tipo éster en los grupos funcionales de tipo ácido carboxílico y alcohol, tal y como se ha expuesto en el esquema 7 del objetivo 2.

Otra técnica que nos permite seguir el proceso de degradación de la mezcla PBAT-PLA es la espetroscopía infrarroja. Esta técnica analiza la medida de absorción de un compuesto o mezcla tras ser sometida a una radiación infrarroja, lo que genera un espectro del mismo, observándose picos y valles en aquellas longitudes de onda donde la muestra absorbe la energía, y que indican la presencia de ciertos grupos funcionales.

En lo que respecta a la biodegradabilidad de la mezcla de PBAT-PLA, las principales absorciones (en función del porcentaje entre ambos compuestos) son lñas referentes al grupo hidroxilo y a los grupos carbonilo, que en nuestro caso se observan a 2930 cm^{-1} y 1690 cm^{-1}, respectivamente.

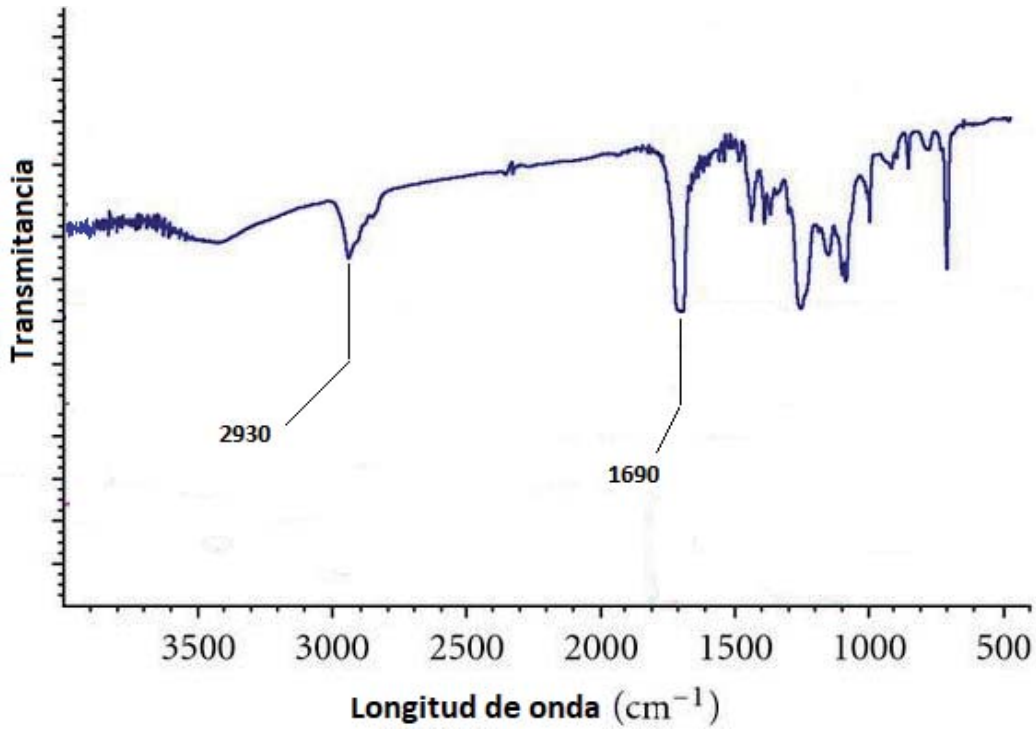


Figura 81. Espectro infrarrojo de la mezcla de PBAT-PLA.

La paulatina degradación de la mezcla generará una modificación del espectro infrarrojo de la mezcla PLA-PBAT, observándose un desplazamiento en la longitud de onda en los grupos hidroxilo (de 2930 a 2973 cm^{-1}) y carbonilo (1690 a 1787 cm^{-1}).

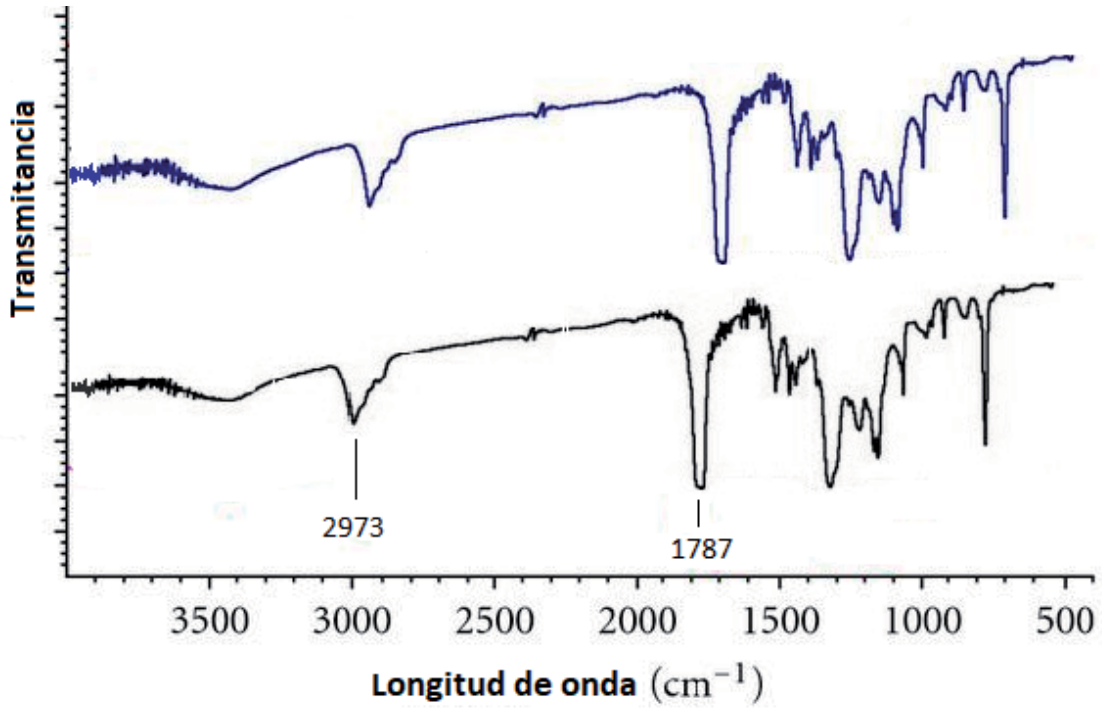


Figura 82. Comparación del espectro infrarrojo de la mezcla de PBAT-PLA antes y tras el periodo de degradación.

2.2.4 Compostaje

La biodegradabilidad de un plástico es un término que corresponde al tiempo de degradación del mismo que debe ser analizado en un sistema de compostaje siguiendo la normativa ISO 20200-2016 que regula los diferentes parámetros (temperatura, humedad relativa y tiempo necesario para su descomposición) que influyen en el proceso.

Los films seleccionados para su estudio de biodegradabilidad en compostaje fueron los enumerados como 45, 49, 50 y 51, cuya diferencia reside en la composición, tal y como puede observarse en la tabla 35.

Figura 83. Film 45 a) antes del compostaje y b) durante el proceso de compostaje.

Figura 84. Film 49 durante el proceso de compostaje.

Figura 85. Film 50 durante el proceso de compostaje.

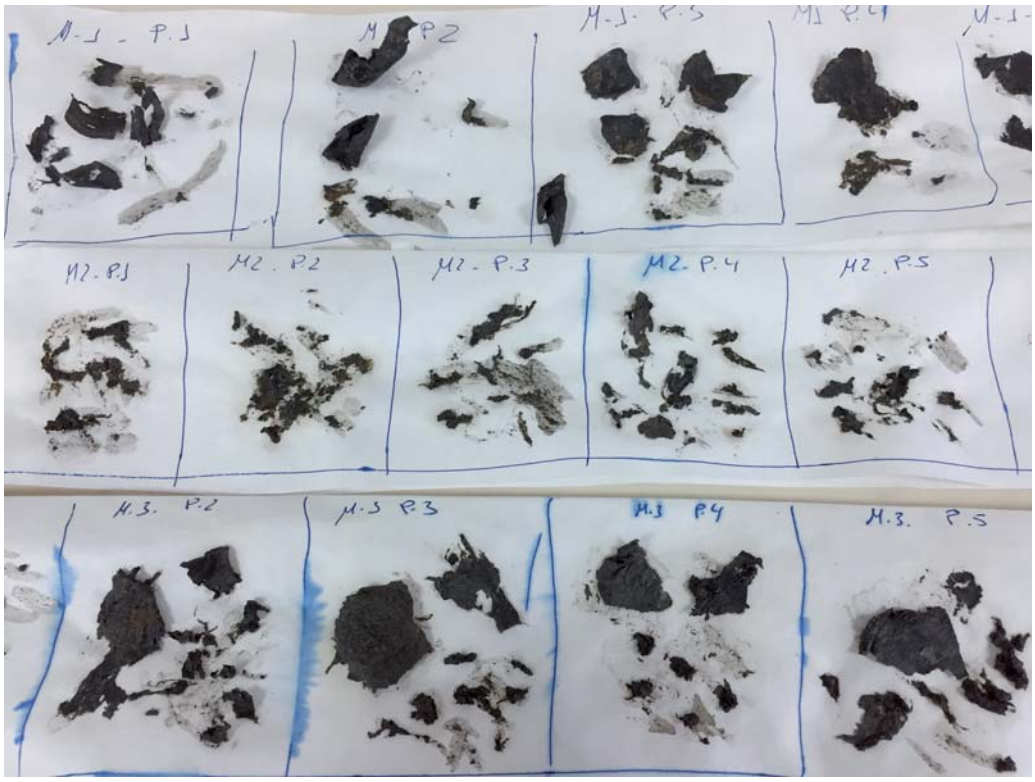


Figura 86. Films tras el proceso de compostaje.

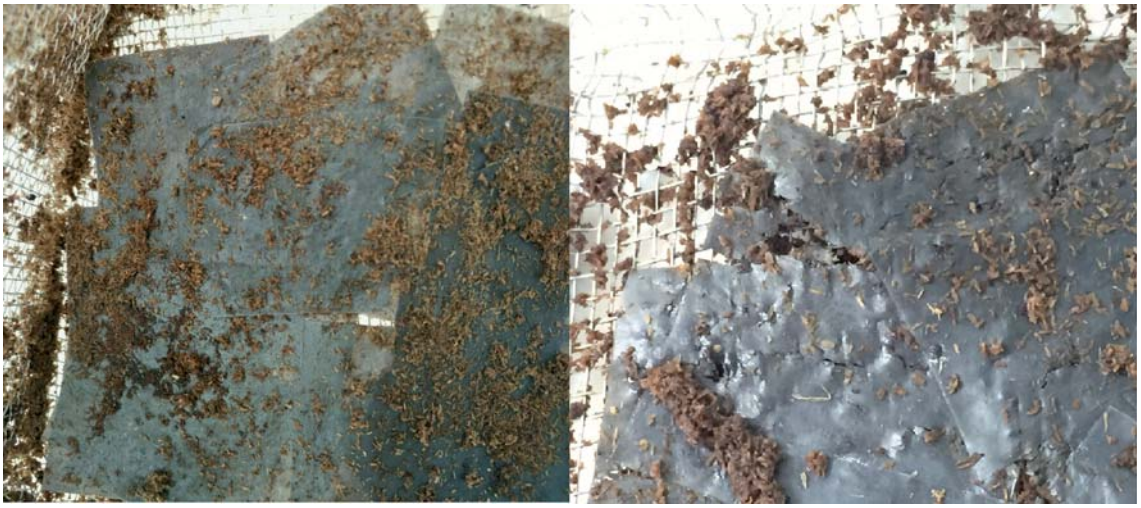


Figura 87. Film 51 tras 5 días en compost (izquierda) y tras 14 días en compost (derecha).

En los films 49 y 50, que contienen las sales micronizadas, el tiempo en el que se observa un proceso de degradación en compostaje es relativamente más bajo (11 días) que para el film 51 (14 días).

En lo que respecta a los films que no poseen las sales micronizadas ni el sorbitol, el tiempo de degradación en compost es superior al del resto.

Debido a la reducción tan significativa del tiempo de degradación de los films en compostaje, se decidió aumentar el espesor de capa con el fin de obtener un mayor tiempo de degradación.

Tabla 36. Valores del espesor obtenido para los films 53 y 54.

	Valores			
FILM 53	71	73	71	74
	76	72	81	76
	80	69	78	75
FILM 54	27	25	25	26
	27	28	25	25
	29	25	24	25

Si calculamos el valor medio para cada film y representamos gráficamente dichos valores:

Tabla X. Valor medio del espesor para los films 53 y 54.

Film	**53**	**54**
Espesor medio	75	25

Tabla 37. Pérdida en peso de los films 53 y 54 en agua.

Film	Peso Inicial	Peso final	Diferencia	% Pérdida
53	78.8	77.8	1.0	1.3
53	97.5	95.8	1.7	1.7
54	38.2	37.4	0.8	2.1
54	46.2	45.4	0.8	2.0

Los films 53 y 54 no poseen como aditivo las sales inorgánicas ni el sorbitol, por lo que su composición es la formada por PBAT-PLA, Biolite, PEG, carbonato de calcio, talco y almidón. Por lo tanto, el porcentaje pequeño de pérdida de peso corresponderá a la solubilidad del almidón y del PEG.

En este apartado se ha observado el aumento significativo que existe en la biodegradación de los films de PBAT-PLA que contienen aditivos como las sales inorgánicas micronizadas o el sorbitol.

Un ensayo de compostaje realizado con los films 53 y 54 reveló que el almidón tiene un papel importante en el tiempo de biodegradación. Este hecho se puede observar tras 14 días en compostaje.

La diferencia existente entre los films 53 y 54 es el porcentaje, teniendo un 10% el film 53 y un 5% el film 54. En compost, se observa un incremento significativo en la degradación del film 53 con respecto al 54 debido a esa mayor proporción de almidón existente, a pesar de tener un espesor de capa éste último mayor (75 micras con respecto a 25 micras).

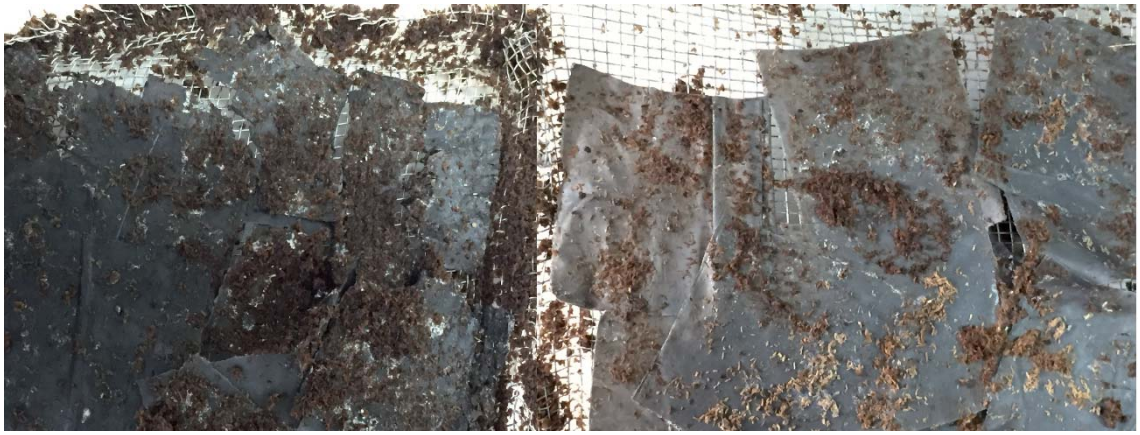


Figura 88. Films en compostaje tras 14 días de los films 53 (izquierda) y 54 (derecha).

Figura 89. Films en compostaje tras 29 días de los films 53 (izquierda) y 54 (derecha).

2. Conclusiones.

Objetivo 1. Investigación y obtención de nuevas formulaciones de ácido poliláctico con mayor capacidad de degradación

Objetivo 1.1: Investigación y obtención de nuevos aditivos al ácido poliláctico

A. Se ha incorporado de manera efectiva almidón (desde un 5 a un 7%) como aditivo de carga a todas las formulaciones obteniendo films con buenas propiedades mecánicas y con una mayor capacidad de absorción de agua.
B. Se ha reducido el tamaño de partícula del quitosano para facilitar su inclusión como aditivo a los films.
C. Se ha incorporado polietilenglicol de distintos pesos moleculares a los films para aumentar el carácter hidrofilico del film y facilitar un aumento de absorción de agua.
D. Se ha incorporado un porcentaje de carbonato de calcio a las formulaciones para favorecer el proceso de hidrólisis.

Objetivo 1.2: Investigación, obtención e inclusión de nuevos aditivos encapsulados con enzima proteinasa K que permitan un mayor grado de biodegradabilidad del PLA.

E. Se ha obtenido proteinasa K encapsulada en almidón liofilizado que se ha incorporado a los films observando una buena compatibilidad y una buena actividad enzimática, antes y posterior a la inclusión de la misma en las formulaciones.
F. Se ha obtenido proteinasa K encapsulada sobre compuestos con poder de fertilización observando una buena compatibilidad y una elevada actividad enzimática, antes y posterior a la inclusión de la misma en las formulaciones y obteniendo un porcentaje de desactivación de la enzima dentro del film bajo.
G. Se han obtenido microcápsulas de alginato de sodio y de alginato de calcio observando una mayor actividad enzimática de la proteínasa K en las microcápsulas formadas por una cáscara de alginato de calcio.

H. Se ha obtenido proteinasa K encapsulada directamente sobre PLA y usando como soporte cinamato de sorbitol, observándose una elevada actividad de ambos antes y posterior a la inclusión de ambos en el film.

Objetivo 2. Investigación y obtención de nuevas formulaciones de polibutilen-adipato-co-tereftalato con mayor capacidad de degradación.

Objetivo 2.1: Encapsulación e incorporación de nuevos aditivos al PBAT para aumentar su capacidad de degradación.

I. Se ha estudiado el ángulo de contacto de los diferentes films con el fin de observar si poseen elevada mojabilidad para su estudio de biodegradabilidad con las enzimas en disolución acuosa, observando que el ángulo de contacto es el adecuado debido a la presencia del PEG.

J. Se ha estudiado el espesor de capa de los diferentes films concluyendo que un espesor de capa comprendido entre 20 y 30 micras es óptimo para facilitar la biodegradación de los mismos.

K. Se ha iencapsulado adecuadamente sales micronizadas y sorbitol a las formulaciones con el fin de disminuir el tiempo de degradación de las mismas en compost.

Objetivo 2.2: Investigación y encapsulación de nuevas formulaciones de PBAT y PLA con las enzimas proteinasa K, α-amilasa y lipasa B.

L. Se ha estudiado la adsorción de las tres enzimas sobre un soporte de cinamato de sorbitol y la actividad enzimática, observándose que es elevada.

M. Se ha estudiado la degradación de los films en disoluciones de las tres enzimas observando por diferentes técnicas

(microscopía infrarroja y microscopía electrónica de barrido) que la degradación es efectiva.

N. Por último se ha observado la degradación de los films en compostaje observando que en un periodo de 14-30 días todas las muestras se degradan.