

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de una película de poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato), poliácido láctico y microcelulosa esterificada como empaque de productos agrícolas

Lady Jazmin Bello Rocha

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ingeniería, Programa de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia

2024

Desarrollo de una película de poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato), poliácido láctico y microcelulosa esterificada como empaque de productos agrícolas

Lady Jazmin Bello Rocha

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:

Ph.D. Cesar Augusto Sierra

Codirector:

Ph.D. Diego Alberto Castellanos

Línea de Investigación: Procesos de polimerización y materiales

Grupo de Investigación: Macromoléculas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ingeniería, Programa de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2024

Al medio ambiente y los campesinos de Colombia, quienes han sido mi fuente constante de motivación a lo largo de todo el proceso de desarrollo de este trabajo. Buscando siempre honrar su compromiso con la tierra y contribuir a la construcción de un futuro más sostenible.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Lady Jazmin Bello Rocha

Fecha 26/01/2024

Agradecimientos

Al Profesor Cesar Augusto Sierra, mi Director, le expreso mi sincero agradecimiento por su inquebrantable apoyo a lo largo de esta travesía académica. Agradezco profundamente por haberme acogido en su grupo de investigación y por brindarme no solo enseñanzas valiosas, sino también por fomentar mi curiosidad, respaldar mis ideas y promover el trabajo interdisciplinario. Trabajar bajo su guía ha ampliado significativamente mi perspectiva profesional y personal. A mi co-Director, Diego, le agradezco por compartir su conocimiento y proporcionarme las herramientas necesarias en el ámbito de los alimentos. Su contribución fue crucial tanto para este proyecto como para mi desarrollo como profesional.

Quiero extender mi reconocimiento a la Universidad Nacional de Colombia y al Grupo de Investigación en Macromoléculas, que se convirtieron en mi hogar y familia durante este proceso. Especial gratitud a Vanesa, Néstor y Andrea, quienes no solo fueron mis tutores, sino también aliados fundamentales en este viaje académico. Mi agradecimiento se extiende a todos aquellos que contribuyeron de alguna manera para que este trabajo se llevara a cabo con éxito.

Finalmente, deseo expresar mi agradecimiento a mi familia y, de manera especial, a Brahiam, mi esposo. quienes me respaldaron en cada paso del camino con su apoyo y cariño. A lo largo de este camino, han respaldado cada uno de mis pasos con su incondicional apoyo y cariño. En particular, agradezco a Brahiam por su constante motivación y por tolerar pacientemente todos mis estados de ánimo.

Resumen

Desarrollo de una película de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), poliácido láctico y microcelulosa acetilada como empaque de productos agrícolas

En este trabajo se aborda el desarrollo y se evalúa la aplicación de una película plástica compuesta basada en polímeros biodegradables y un aditivo natural antimicrobiano, como una alternativa sostenible para el manejo postcosecha de productos agrícolas.

En el primer capítulo se hace una revisión de los biopolímeros más prometedores para aplicaciones en la industria del envasado, destacándose el poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato, PHBV) y el poliácido láctico (PLA). Analizando las propiedades fisicoquímicas de sus películas, y su semejanza con las propiedades de los polímeros petroquímicos comúnmente utilizados en empaques, como el polipropileno (PP), polietileno tereftalato (PET), polietileno (PE) o poliamida (PA). Adicionalmente, se hizo una revisión del uso de celulosa como aditivo de refuerzo en películas biodegradables, así como el uso de aceites esenciales naturales para otorgar la característica de empaques activos.

Habiendo seleccionado, con base en la revisión del primer capítulo, a la microcelulosa (MC) y el aceite de limoncillo (LEO) como los aditivos a incorporar en películas de PHBV/PLA, en el segundo capítulo se describen los materiales y las metodologías para la derivatización de la microcelulosa en diferentes condiciones y la extracción de aceite de limoncillo. Esto con el objetivo de otorgarle características hidrofóbicas y antimicrobianas a la película PHBV/PLA/MC-Est.

En el tercer capítulo se hace una evaluación del comportamiento mecánico y como barrera a los gases de una matriz de PHBV con la incorporación de PLA en diferentes proporciones buscando obtener películas rígidas y películas flexibles con propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser usadas en la fabricación de empaques para fresas (empaque rígido)

y chocolate (empaque flexible). Además, se lleva a cabo un caso de estudio para seguir el perfil sensorial del chocolate mientras se almacena en películas de PHBV, con el objetivo de determinar si estas películas son capaces de preservar las características originales del producto.

En el cuarto capítulo, al considerar los resultados obtenidos para las películas de PHBV/PLA del capítulo anterior, se estudia la incorporación de un aditivo de refuerzo que mejore la compatibilidad entre el PHBV y el PLA, y así potenciar las propiedades mecánicas y de barrera a los gases de dichas películas. En este contexto, se lleva a cabo un análisis del proceso de producción de microcelulosa esterificada (MC-Est), centrándose en el estudio de las condiciones de reacción, como el tiempo y la temperatura, durante la síntesis de MC-Est. El propósito de este análisis es determinar su influencia en el grado de sustitución (GS) y la hidrofobicidad de la molécula, factores que afectan las propiedades de barrera y compatibilidad de la película resultante.

En el quinto capítulo se presentan los resultados de la incorporación de MC-Est en las películas de PHBV/PLA y PHBV. En la mezcla de PHBV/PLA la adición de MC-Est se utiliza como refuerzo mecánico para mejorar la compatibilidad entre estos dos polímeros, estudiando el impacto en las propiedades mecánicas y de barrera. Para las películas de PHBV, la incorporación de la MC-Est busca reducir la permeabilidad al vapor de agua.

Finalmente, en el sexto capítulo, con el objetivo de explorar aditivos “verdes” que puedan aportar un valor agregado a los envases biodegradables y prolongar la vida útil de los productos agrícolas frescos, como las frutas, se investiga el uso del aceite esencial de limoncillo (LEO) como un aditivo activo antimicrobiano. En este estudio se exponen los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* del LEO contra el hongo *Botrytis cinérea* usando las fresas como producto agrícola.

Palabras clave: Biopolímeros, PHBV, PLA, MC, MC-Est, acetilación, aceite de limoncillo.

Abstract

Development of a film of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), polylactic acid and acetylated micro cellulose as packaging for agricultural product

In this work, the development and application of a composite plastic film based on biodegradable polymers and a natural antimicrobial additive as a sustainable alternative for postharvest management of agricultural products.

The first chapter provides a review of the most promising biopolymers for applications in the packaging industry, highlighting poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV), and polylactic acid (PLA). The physicochemical properties of their films are analyzed, drawing parallels with properties of commonly used petrochemical polymers in packaging, such as polypropylene (PP), polyethylene terephthalate (PET), polyethylene (PE), or polyamide (PA). Additionally, a review is conducted on the use of cellulose as a reinforcing additive in biodegradable films, as well as the use of natural essential oils to impart active packaging characteristics.

Based on the review in the first chapter, micro cellulose (MC) and lemongrass oil (LEO) were selected as additives to be incorporated into PHBV/PLA films. The second chapter describes the materials and methodologies for the derivatization of micro cellulose under different conditions and the extraction of lemongrass oil. This aims to impart hydrophobic and antimicrobial characteristics to the PHBV/PLA/MC-Est film.

The third chapter evaluates the mechanical behavior and gas barrier properties of a PHBV matrix with the incorporation of PLA in different proportions, aiming to obtain rigid films for strawberry packaging (rigid packaging) and flexible films for chocolate packaging. Additionally, a case study is conducted to monitor the sensory profile of chocolate stored in PHBV films to determine if these films can preserve the original product characteristics.

Considering the results obtained for PHBV/PLA films in the previous chapter, the fourth chapter studies the incorporation of a reinforcing additive to improve compatibility between PHBV and PLA, enhancing the mechanical and gas barrier properties of these films. In this context, an analysis of the production process of esterified micro cellulose (MC-Est) is conducted, focusing on studying reaction conditions such as time and temperature during MC-Est synthesis to determine their influence on the degree of substitution (DS) and molecule hydrophobicity, factors that affect the barrier and compatibility properties of the resulting film.

Results of incorporating MC-Est into PHBV/PLA and PHBV films are presented in this chapter. In the PHBV/PLA blend, the addition of MC-Est is used as a mechanical reinforcement to improve compatibility between these two polymers, studying its impact on mechanical and barrier properties. For PHBV films, the incorporation of MC-Est aims to reduce water vapor permeability.

The final chapter explores "green" additives that can add value to biodegradable packaging and extend the shelf life of fresh agricultural products, such as fruits. The study investigates the use of lemongrass essential oil (LEO) as an active antimicrobial additive, presenting results from *in vitro* and *in vivo* tests against *Botrytis cinerea* using strawberries as the agricultural product.

Keywords: Biopolymers, PHBV, PLA, MC, MC-Est, acetylation, lemongrass oil.

Contenido

1. Consideraciones conceptuales	9
1.1 Materiales compuestos biodegradables	10
1.1.1 Biopolímeros extraídos de microorganismos	12
1.1.2 Biopolímeros obtenidos de monómeros bioderivados	14
1.1.3 Compósitos de PHBV/PLA.....	14
1.2 Celulosa como refuerzo	16
1.2.1 Funcionalización de microcelulosa	18
1.3 Extractos de aceites volátiles como agentes activos en empaques.....	20
1.3.1 Aceite de limoncillo	22
1.4 Principales empaques en el mercado agrícola	25
2. Metodología experimental	28
2.1 Insumos	30
2.2 Esterificación de microcelulosa	30
2.2.1 Reacción de esterificación de microcelulosa	30
2.2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	32
2.2.3 Determinación del grado de sustitución (GS) por medio de espectroscopia infrarroja (FTIR)	32
2.2.4 Ensayo de hidrofobicidad por medición del ángulo de contacto	32
2.2.5 Molienda y tamizaje de la MC	33
2.2.6 Análisis de tamaño de partícula	33
2.3 Obtención de matrices poliméricas.....	33
2.3.1 <i>Solvent casting</i> de películas PHBV/PLA	33
2.3.2 Extrusión de películas PHBV/PLA	34
2.3.3 Extrusión de películas PHBV/PLA/MC-Est	34
2.4 Técnicas de caracterización de las láminas.	35
2.4.1 Ensayo de tensión – deformación.....	35
2.4.2 Ensayo de absorción al agua.....	35
2.4.3 Ensayo de hidrofobicidad por medición del ángulo de contacto	36
2.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	36
2.4.2 Permeabilidad al vapor de agua	36
2.4.3 Permeabilidad al oxígeno.....	37
2.4.4 Estereoscopia	37
2.4.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	38
2.4.6 Análisis termogravimétrico (TGA)	38
2.5 Caso de estudio – Almacenamiento de chocolate.....	38
2.6 Extracción de aceites esenciales.....	39
2.6.1 Hidrodestilación de aceite esencial de limoncillo	39
2.7 Determinación de carácter antimicrobiano	40

2.7.1	Prueba <i>in vitro</i> de efectos inhibidores	40
2.7.2	Ensayos <i>in vivo</i>	41
2.7.3	Caso estudio- Almacenamiento de fresas incluyendo en el empaque una lámina de PHBV/PLA/MC-Est.....	42
3.	Desarrollo de la matriz polimérica PHBV/PLA	43
3.1	Introducción	44
3.2	Resultados y discusión	44
3.2.1	Películas por <i>solvent casting</i> de PHBV/PLA	44
	Absorción de agua e hidrofobicidad	48
3.2.3	Películas de PHBV/PLA por Extrusión	50
	Absorción de agua y barrera a gases en películas por extrusión	54
	Análisis estructural por FTIR	58
	Propiedades térmicas	60
3.2.4	Caso de estudio – Almacenamiento de chocolate	61
3.3	Conclusiones	64
4.	Esterificación de la microcelulosa	66
4.1	Introducción	67
4.2	Resultados y discusión	68
4.2.1	Evaluación de las condiciones de reacción	68
4.2.2	Caracterización de productos GS variable	72
4.2.3	Optimización de agente de acetilación	73
4.2.4	Análisis de tamaño de partícula	75
4.3	Conclusiones	79
5.	Introducción de la microcelulosa funcionalizada (MC-Est) en la matriz polimérica PHBV/PLA	81
5.1	Introducción	82
5.2	Resultados y discusión	83
5.2.1	Películas por <i>solvent casting</i>	83
5.2.2	Películas por extrusión de PHBV/PLA/MC-Est	83
5.2.3	Caracterización películas PHBV/PLA/MC-Est	85
5.3	Conclusiones	98
6.	Estudio exploratorio del aceite esencial de limoncillo como agente antimicrobiano para empaques de alimentos	101
6.1	Introducción	102
6.2	Resultados y discusión	103
6.2.1	Obtención de extracto de limoncillo y caracterización.	103
6.2.2	Efecto inhibitorio de <i>Botritis cinerea</i> (ensayo <i>in vitro</i>)	104
6.2.3	Prueba <i>in vivo</i> de efectos inhibidores	105
6.2.4	Caso de estudio - Almacenamiento de fresas incluyendo en el empaque una lámina de PHBV/PLA/MC-Est.....	110
6.3	Conclusiones	113
7.	Conclusiones generales y recomendaciones	115
7.1	Conclusiones	115
7.2	Recomendaciones	117

Lista de figuras

Figura 1. Clasificación de los polímeros según su fuente y biodegradabilidad. ¹⁵	11
Figura 2. Clasificación de biopolímeros según su origen.....	12
Figura 3. Estructura química del PH3B, PHV y PHBV.....	13
Figura 4. Mecanismo de reacción de la acetilación de celulosa con anhídrido acético, y ácido cítrico como catalizador.....	19
Figura 5. Estructuras de los principales compuestos de LEO geranial (α -citral), neral (β -citral) y geraniol.....	23
Figura 6. Demanda de plástico por aplicación y tipo de polímero 2022. ⁸⁵ Donde, PS es poliestireno, EPS poliestireno expandido, ABS acrilonitrilo butadieno estireno, PMMA Polimetilmetacrilato, PC policarbonato y PUR poliuretano.	25
Figura 7. Extractor por arrastre de vapor a escala piloto del laboratorio de Productos Naturales Vegetales del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.....	40
Figura 8. Películas obtenidas por <i>solvent casting</i> utilizando como solvente cloroformo, DMF y ácido acético (Donde las “X” significa que no se logró obtener una película).	45
Figura 9. Curvas de esfuerzo-deformación de películas de PHBV/PLA por <i>solvent casting</i> (SC) en proporciones de PHBV/PLA de 100/0, 80/20, 60/40 y 50/50.....	46
Figura 10. Curvas de absorción al agua de películas PHBV/PLA realizadas por <i>solvent casting</i>	49
Figura 11. Estereoscopia de las películas PHBV/PLA 50/50; a) <i>solvent casting</i> (SC) b) extrusión (Ext).....	51
Figura 12. Curvas de esfuerzo-deformación de PHA/PLA por extrusión de muestras longitudinales y transversales. Y encuellamiento presentado por la probeta 50/50 durante el experimento.....	52
Figura 13. a) Representación esquemática de la probeta utilizada en ensayos mecánicos b) Resistencia a la tracción en diferentes orientaciones de la fibra con respecto a la dirección de carga. ¹⁰¹	53
Figura 14. Curvas de absorción al agua de películas de PHBV/PLA por <i>solvent casting</i> y extrusión.....	55
Figura 15. Análisis FTIR de películas PHBV, PLA y PHBV/PLA realizadas por extrusión (Ext) y <i>solvent casting</i> (SC).....	59
Figura 16. Curvas TG y DTG de PHBV, PLA y mezcla PHBV/PLA 50/50.....	60
Figura 17. Barra de chocolate al 90% empacada en películas de PHBV.	61
Figura 18. Perfil característico de chocolate al 85% y 90% de chocolate. La percepción se evalúa en una escala de 0 a 5, donde 5 representa una percepción muy fuerte, 4 es fuerte, 3 es moderado, 2 es débil, 1 es apenas reconocible, y 0 es no presenta.	62

Figura 19. Perfil de sabor del chocolate al 85% y al 90% de cacao. La percepción se evalúa en una escala de 0 a 5, donde 5 representa una percepción muy fuerte, 4 es fuerte, 3 es moderado, 2 es débil, 1 es apenas reconocible, y 0 es no presenta.	63
Figura 20. Perfil característico, de sabor y defectos de chocolate al 85% y 90% de cacao empacado en PHBV. La percepción se evalúa en una escala de 0 a 5, donde 5 representa una percepción muy fuerte, 4 es fuerte, 3 es moderado, 2 es débil, 1 es apenas reconocible y 0 es no presenta.	64
Figura 21. Espectros de la MC-Est variando el tiempo de reacción de acetilación a temperaturas de a) 100°C, b) 120°C, y c) 140°C.	69
Figura 22. Grado de sustitución (GS) de la MC-Est en función del tiempo y la temperatura de reacción.	70
Figura 23. Ángulo de contacto de la MC-Est en función del tiempo y la temperatura de reacción. Donde la MC sin funcionalizar tiene un ángulo de contacto de 0°.	71
Figura 24. Curvas de TGA y DTG para MC pura y MC-Est obtenidas con temperatura de reacción a 100°C y 140°C, y tiempo de reacción de 24 h.	73
Figura 25. Distribución de tamaño de partículas de MC y MC-Est, donde MT simboliza el proceso de molienda y tamizaje, y “prev” si se realizó previamente al proceso de funcionalización.	76
Figura 26. Ilustración de la interacción entre las partículas de MC (esferas rojas completas), MC-Est (esfera roja con hilos morados), MC-Est molida y tamizada (media-esferas rojas) y MC-Est MT prev (media-esferas rojas con hilos morados) con una gota de agua (esfera azul).	79
Figura 27. Aspecto películas de PHBV/PLA/MC-Est realizadas por <i>solvent casting</i>	83
Figura 28. Aspecto películas de PHBV/PLA/MC-Est extruidas.	84
Figura 29. Películas de PHBV/PLA 50/50 extruidas variando la cantidad de MC-Est.	85
Figura 30. Curvas de esfuerzo-deformación de PHA/PLA/MC-Est fabricadas por a) <i>Solvent casting</i> y b) Extrusión con corte longitudinal.	86
Figura 31. Ruptura de las películas con y sin <i>masterbach</i>	87
Figura 32. Curvas de esfuerzo vs deformación de las películas PHBV/PLA 50/50 variando proporción de MC-Est.	87
Figura 33. Estereoscopia de películas de PHBV/PLA 50/50 extruidas variando la cantidad de MC-Est.	89
Figura 34. Curvas de absorción al agua de las muestras PHBV/PLA/MC-Est variando el porcentaje de MC-Est.	91
Figura 35. Angulo de contacto de las películas PHBV/PLA/MC-Est variando la proporción de MC-Est.	92
Figura 36. Estereoscopia de películas de PHBV/PLA/MC-Est 50/50/2% tamizada previamente o después de la funcionalización, con adición de glicerol (GLI) y sin adición de glicerol.	96
Figura 37. Curvas TG y DTG de películas PHBV/PLA/MC-Est con PHBV/PLA 50/50 variando proporción de MC-Est.	97
Figura 38. Calorimetría diferencial de barrido de películas de PHBV/PLA/MC-Est con PHBV/PLA 50/50 variando proporción de MC-Est.	98

Figura 39. Espectroscopia infrarroja de a) aceite esencial de limoncillo (LEO) y b) citral. ¹¹⁷	104
Figura 40. Montaje ensayo prueba <i>in vivo</i> de efecto inhibitorio de LEO-HD en fresas...	106
Figura 41. Aspecto físico de las muestras en el quinto día de la prueba.....	108
Figura 42. Pérdida de peso de los empaques con LEO-HD en pruebas <i>in vivo</i> en el almacenamiento de fresas.	110
Figura 43. Montaje ensayo prueba <i>in vivo</i> de efecto inhibitorio de LEO-HD en fresas con adición de película de PHBV/PLA/MC-Est.	111
Figura 44. a) Aspecto físico de las muestras en el quinto día de la prueba, b) Pérdida de peso de los empaques con 100 µL/L de LEO-HD en pruebas <i>in vivo</i> de fresas con película de PHBV/PLA/MC-Est.	113

Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades del poli(3-hidroxi butirato) (PHB) y poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV).	14
Tabla 2. Propiedades del poliácido láctico (PLA).	14
Tabla 3. Estudios de las mezclas de PHBV y PLA.	15
Tabla 4. Estudios de mezclas de PHBV, PLA y aditivos.	17
Tabla 5. Búsqueda estratégica aceites esenciales.	21
Tabla 6. Composición del aceite de limoncillo (LEO) ⁸⁰	23
Tabla 7. Matrices poliméricas con inclusión de LEO	24
Tabla 8. Propiedades mecánicas y de barrera de polímeros usados en empaques de la agroindustria.	26
Tabla 9. Escala tipo A de evaluación de intensidad de atributos. ⁹²	39
Tabla 10. Escala empírica de 6 puntos para análisis de gravedad de enfermedad.	42
Tabla 11. Propiedades mecánicas de películas de PHBV/PLA por <i>solvent casting</i> variado las proporciones de PHBV y PLA.	47
Tabla 12. Angulo de contacto de películas de PHBV/PLA realizadas por <i>solvent casting</i>	50
Tabla 13. Propiedades mecánicas del corte longitudinal de películas PHBV/PLA obtenidas por extrusión comparadas a las reportadas para el PP, PET, PE-HD y PA.....	54
Tabla 14. Angulo de contacto de películas PHBV/PLA por extrusión.....	56
Tabla 15. Permeabilidad al vapor de agua de películas de PHBV/PLA por <i>solvent casting</i> (SC) y por extrusión (Ext).	56
Tabla 16. Permeabilidad al Oxígeno de películas de PHBV.....	58
Tabla 17. Optimización de agente de acetilación anhídrido acético (AA) teniendo como catalizador el ácido cítrico.....	74
Tabla 18. Tamaño de partícula de muestras de MC y MC-Est.....	77
Tabla 19. Angulo de contacto de MC y MC-Est después de proceso de molienda y tamizaje.....	78
Tabla 20. Propiedades mecánicas de películas PHBV/PLA/MC- Est.....	88
Tabla 21. Permeabilidad al vapor de agua de películas de PHBV/PLA 50/50 y PHBV variando proporción de MC-Est.	93
Tabla 22. Permeabilidad y ángulo de contacto de películas de PHBV con MC-Est tamizada y sin tamizar.	95
Tabla 23. Caracterización del aceite de limoncillo.	103
Tabla 24. Efecto inhibitorio de volátiles de aceite de limoncillo extraído por hidrodestilación (LEO-HD) y comercial (LEO-CO) en concentraciones 125 µL/L contra <i>Botritis Cinerea</i>	105

Tabla 25. Resultados de ensayos <i>in vivo</i> de fresas con LEO-HD.	107
Tabla 26. Aceptabilidad de la fresa variando la proporción de LEO-HD a 5 días de almacenamiento.	109
Tabla 27. Resultados de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en almacenamiento de fresas con LEO-HD y película de PHBV/PLA/MC-Est 50/50/1.5 en la parte superior del empaque.	111
Tabla 28. Aceptabilidad de la fresa variando la proporción de LEO-HD y adición de lámina de PHBV/PLA/MC-Est al empaque a 5 días de almacenamiento.	112

Lista de Símbolos y abreviaturas

Subíndices

Subíndice	Término
O ₂	Oxígeno
H ₂ O	Agua

Superíndices

Superíndice	Término
n	Exponente, potencia

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>PHA</i>	Polihidroxicanoatos
<i>PHBV</i>	Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)
<i>PLA</i>	Poliácido láctico
<i>MC</i>	Microcelulosa
MC-Est	Microcelulosa esterificada
SC	<i>Solvent Casting</i>
Ext	Extrusión
PP	Polipropileno
PE-LD	Poliétileno de baja densidad
PA	Poliamida
LEO	Aceite esencial de limoncillo
T _g	Temperatura de transición vítrea
T _m	Temperatura de fusión
Q _{O₂}	Coficiente de permeabilidad al oxígeno
Q _{H₂O}	Coficiente de permeabilidad al vapor de agua
WVTR	Velocidad de transmisión de vapor de agua
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

Introducción

Cada día es más creciente la preocupación por la contaminación derivada del consumo de plásticos, los cuales afectan los ecosistemas y ocasionan efectos sobre el medio ambiente, los recursos naturales y los seres vivos. Se estima que en el 2021 se produjeron alrededor de 390.7 millones de toneladas de plástico de los cuales solo el 1.5% es de origen natural,¹ y posiblemente biodegradable. La principal aplicación de los plásticos se encuentra en la industria de envases y empaques con una participación del 44% y un incremento del 4% anual sostenido.² Desafortunadamente, estos empaques son categorizados como de un solo uso ya que se emplean principalmente en la industria de alimentos, convirtiendo a esta industria en la principal productora de residuos plásticos. Cabe resaltar que estos empaques son indispensables, ya que son usados para proteger a los productos alimenticios perecederos del daño mecánico y de las posibles deficiencias que se pueden dar en la manipulación, almacenamiento y transporte.³ En esta aplicación, los empaques deben exhibir propiedades mecánicas idóneas para garantizar la estabilidad y facilitar la manipulación del producto durante su almacenamiento y transporte. Así mismo, es esencial que posean una eficiente barrera a los gases, ya que un adecuado control en el intercambio de gases puede contribuir a prevenir la deshidratación, sobremaduración, descomposición y a mantener la seguridad y las características sensoriales del producto. Hasta el momento, los únicos materiales que han mostrado ser eficaces en llevar a cabo esta tarea son los polímeros convencionales como polietileno, polipropileno y poliamidas. Y ya que estos tres polímeros mencionados son poco degradables, lo cual los hace altamente participes en el problema de contaminación mencionado antes, se requiere de su sustitución por nuevos materiales poliméricos, específicamente en la fabricación de empaques, para satisfacer los requerimientos de la industria agroalimentaria, pero con alta velocidad de degradación lo cual contribuirá a la disminución de la contaminación por plásticos.⁴

Teniendo en cuenta lo antes mencionado y las crecientes restricciones sobre plásticos no degradables en Europa y Norte América, Colombia tiene que reducir la generación de residuos plásticos con el fin de cumplir con las políticas de sostenibilidad ambiental nacional e internacional como se nombra en el plan nacional para la gestión sostenible de los plásticos de un solo uso.⁵ A su vez, se tienen que buscar materiales poliméricos adecuados que permitan que la comercialización y exportación de alimentos,

especialmente las frutas frescas, no se vea afectada. Una de las posibles soluciones está en el desarrollo de empaques plásticos basados en polímeros biodegradables con propiedades fisicoquímicas tales que puedan satisfacer los requerimientos de los empaques para alimentos. De nuevo, haciendo énfasis en la exportación de frutas frescas, ya que de acuerdo con cifras del DANE y ProColombia, para el 2022, las exportaciones de frutas exóticas sumaron 98.7 millones de dólares, haciendo que Colombia se consolide como el noveno país exportador de frutas exóticas.⁶ En particular las frutas exóticas más exportadas son gulupa, uchuva, granadilla, pitahaya, arándanos, tomate de árbol y maracuyá.⁷ Todas estas, frutas que requieren materiales de empaque con propiedades barrera a los gases, propiedades mecánicas, y propiedades fisicoquímicas específicas y muy controladas para permitir tiempos de almacenamiento y transporte hasta por 40 días.

Cabe resaltar que algunos países están incorporando nuevas políticas contra el uso de empaques plásticos no biodegradables. Europa instituyó la directiva UE 2018/852, la cual indica que se debe hacer una sustitución del plástico por materiales biodegradables para el año 2025.⁸ Esto es altamente preocupante para los productores y exportadores de productos agrícolas, sobre todo considerando que los países europeos aumentaron sus compras en frutas exóticas en un 29.7% en el 2021, con un estimado de USD 32.1 millones.⁹ Esta directiva perjudicaría la exportación de productos frescos por parte de Colombia, ya que no existe en el mercado mundial un empaque biodegradable que reemplace a los empaques convencionales usados actualmente para la exportación de frutas. Adicionalmente, nuestro país no cuenta con industrias productoras de polímeros biodegradables y la compra de estos a industrias extranjeras, elevaría los precios de producción de un empaque. Esto conlleva a que se vuelva de vital importancia para la agroindustria colombiana el desarrollo de empaques biodegradables para el manejo postcosecha de frutas frescas, así como el desarrollo de tecnologías a escala industrial para la producción de polímeros biodegradables.

Dentro de los polímeros con características apropiadas para lograr el objetivo antes mencionado, por ser biodegradable y con propiedades similares al de los plásticos convencionales (ejemplo. polietileno y polipropileno), está la familia de los poli hidroxialcanoatos (PHAs).¹⁰⁻¹² Polímeros con tiempos de degradación menores a un año¹³ y considerados como biopolíésteres bacterianos, ya que son enzimáticamente sintetizados utilizando bacterias.¹⁴ Dentro de los PHAs, el polihidroxibutirato (PHB) ha llamado la

atención por sus propiedades de barrera, transparencia, baja absorción de agua, buena barrera a la luz UV y luz visible, y una elongación a la rotura entre 3 y 10%.¹⁵ Sin embargo, la alta cristalinidad del PHB lo hace un material frágil, el cual además presenta problemas de procesabilidad ya que su temperatura de descomposición es muy cercana a la de fusión, haciendo que el rango de temperaturas para su procesamiento sea muy reducida, llevando a que durante procesos como la extrusión, el PHB sufra degradación térmica.¹⁶ Teniendo en cuenta esto, se ha estudiado el uso de copolímeros de PHB como el poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) o PHBV, el cual se origina a partir de la introducción de unidades de 3-hidroxi-valerato (HV) al PHB.

Es importante resaltar que, aunque el PHBV cuenta con propiedades fisicoquímicas superiores al PHB, no son comparables a las presentadas por los polímeros convencionales. En particular, las propiedades mecánicas y térmicas, ya que exhibe baja resistencia al impacto, alta fragilidad y deficiente estabilidad térmica,¹⁷ generando problemas en su procesabilidad. Para abordar estos problemas, los investigadores han explorado el uso de materiales híbridos, que implica la combinación de dos o más materiales. Por lo cual se han estudiado las mezclas de PHBV o PHB con otros polímeros, encontrando al poliácido láctico (PLA) como uno de los materiales con mayor potencial para mejorar el procesamiento de los PHAs.^{18,19} El PLA es un polímero termoplástico, biodegradable bajo condiciones de compostaje industrial, que cuenta con buenas propiedades térmicas y mecánicas,²⁰ pero con una alta permeabilidad, alta hidrofiliidad y baja cristalinidad.²¹ Se ha reportado que en matrices poliméricas de PLA la adición de 24% en peso de PHBV proporciona un efecto de refuerzo y mejores propiedades mecánicas en comparación con el PLA puro.²² También se han desarrollado películas en procesos de extrusión y soplado, que con la adición de 30% de PHBV mejoran la cristalinidad del PLA, provocando el aumento de la rigidez, las propiedades de barrera y la capacidad de filtración de la luz, al igual que se aumentó la ductilidad de las películas.²³

Estos estudios muestran que la mezcla de PHBV y PLA produce una matriz polimérica con mejores propiedades fisicoquímicas y mecánicas que sus componentes individuales. Sin embargo, muy pocos estudios muestran al PHBV como la matriz principal. Lo cual puede estar relacionado con el mayor costo del PHBV, o con el hecho de que el PHBV tiene mayores problemas de procesamiento que el PLA, o que la compatibilidad de las películas PLA/PHAs se ve afectada cuando se usa más PHAs que PLA. Teniendo en cuenta estos

precedentes, y la intención de usar el PHBV como matriz principal (por razones que se expondrán más adelante) se propone mejorar las propiedades de la mezcla PHBV/PLA mediante el uso de aditivos que solucionen los problemas antes mencionados. Uno de los cuales es la celulosa, la cual se ha utilizado como aditivo para mejorar las propiedades mecánicas de la mezcla de estos dos biopolímeros y actuar como un “adhesivo” o “compatibilizante” entre ellos.^{16,24,25} Cabe señalar que en la mayoría de estos estudios se ha utilizado nanocelulosa, la cual por su tamaño podría dar mejores resultados. Sin embargo, la nanocelulosa requiere de procesos complejos para su incorporación por extrusión en matrices de PHBV y PLA, y no está disponible comercialmente a escala industrial en Colombia, lo que aumentaría el costo final del empaque desarrollado.^{26, 27}

Los problemas de la nanocelulosa durante la extrusión se deben a que esta comercialmente está disponible en diluciones acuosas, haciendo que su incorporación durante un proceso de extrusión requiera pretratamientos,²⁸ de nuevo, incrementando el costo del empaque desarrollado. Por lo cual se propone el uso de microcelulosa (MC), la cual es mucho más económica y comercialmente disponible a escala industrial de forma sólida, facilitando el proceso de extrusión de los materiales. Adicionalmente, para mejorar su afinidad química con la matriz polimérica y proporcionar una mejora en las propiedades de barrera, los grupos hidroxilo (-OH) presentes en la estructura de la microcelulosa (MC) se pueden cambiar para modificar a necesidad de la hidrofobicidad de las partículas. Por lo cual, en la literatura se encuentran reacciones sobre la MC de esterificación,²⁹ acetilación,³⁰ y amidación,³¹ entre otras. Estudios con celulosa bacteriana acetilada han arrojado que el contenido óptimo para obtener un fortalecimiento sobre PHBV es del 1.2%, generando un aumento de la resistencia a la flexión y el módulo de flexión de 44.7% y 34.5% en comparación con el PHBV puro.³²

Al introducir características hidrófobas en las matrices poliméricas a través de la celulosa derivatizada, se puede lograr un aumento de las propiedades de barrera, como la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno. Los estudios realizados por Ariza en la Universidad Nacional de Colombia han demostrado que la adición de MC acetilada a una película de PLA puede reducir la velocidad de transmisión de vapor en un 20%.³³ Esta disminución de la permeabilidad en empaques de PLA es beneficiosa para los productores y comerciantes de productos agrícolas, ya que el producto empacado pierde menos peso por deshidratación, y podría conservar por más tiempo sus características organolépticas.

Del mismo modo, reducir la permeabilidad al oxígeno es crucial para productos que puedan tener oxidación lipídica, la cual genera enranciamiento del alimento y la formación de *off-flavors*,³⁴ muy común en productos como los frutos secos o el chocolate. De ahí la importancia de generar materiales de embalaje provenientes de biopolímeros como el PHBV y PLA con propiedades de barrera mejoradas, los cuales pueden ayudar a proteger los productos y conservar su calidad. Cabe resaltar que hasta el momento no se han reportado estudios de propiedades de barrera para la mezcla PHBV/PLA con adición de MC derivatizada.

Por otra parte, hoy en día se están implementando nuevas tendencias en los empaques de alimentos, como lo son sistemas con atmósferas modificadas y los empaques activos e inteligentes, respondiendo así a las necesidades que tiene el mercado. Actualmente, se estima que en los países en desarrollo se pierde alrededor del 40% de los productos frescos durante la etapa de cosecha y postcosecha,³⁵ principalmente por sobremaduración y problemas fitosanitarios. También se estima que el 50% de los costos de producción agrícola se concentran en la etapa de postcosecha, la cual puede durar de una semana a 45 días, por lo cual, aumentar la vida útil del producto es la mayor prioridad del proceso.³⁶ Unas de las opciones para extender la vida útil de los productos frescos es la incorporación de aditivos al empaque, los cuales pueden servir como controladores de maduración, temperatura, catalizadores, absorbentes (humedad, oxígeno, etileno, volátiles) o como emisores de antioxidantes, antimicrobianos, aromas y preservantes.³⁷

Para el caso específico de los emisores, se ha tratado de implementar el uso de extractos naturales, como agentes antimicrobianos y antioxidantes, entre los que se resalta el aceite esencial de orégano, romero, menta, limoncillo, citronela y salvia.³⁸ De estos, se ha utilizado el aceite esencial de orégano en empaques de PHBV/PLA para la preservación de filetes de pez globo en almacenamiento, donde se obtuvo una ampliación de la vida útil del producto de 2-3 días a 4°C con una concentración del aceite de 9.70 mg/kg.³⁹ Por otra parte, se han estudiado las propiedades mecánicas del PHBV tras la adición del aceite esencial de citronela-canela, encontrando una mejoría en la estabilidad térmica de la película y reducción de la temperatura de fusión.⁴⁰ Adicionalmente, varios estudios *in vitro* muestran que el aceite esencial de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) tiene actividad antimicrobiana contra el hongo de *Botrytis cinerea*,^{41,42} en frutas como la fresa. Con la ventaja que este aceite tiene poca afectación en las propiedades organolépticas del

producto empacado, en comparación con otros aceites como el de tomillo, pimienta y litsea, que debido a su fuerte olor, contaminan lo que este empacado.⁴³ Es importante resaltar que el aceite esencial de limoncillo (LEO) se ha incorporado a diferentes películas biodegradables; Ruskova y colaboradores encapsularon LEO en una película de PLA y PHB para el almacenamiento de fresas donde se encontró que una película de PLA/PHB+5% de LEO mostró mejores resultados que una donde se utilizaba 5% de aceite esencial de orégano.⁴⁴

De manera que, el PHBV se puede usar como polímero en el desarrollo de empaques biodegradables para alimentos, donde se requiere buena flexibilidad, elongación y transparencia del material, lo cual se puede obtener mediante la mezcla con aditivos como PLA, y MC derivatizada. Por lo cual, este proyecto se enfocó en encontrar las proporciones adecuadas de PLA y MC esterificada por medio de acetilación (MC-Est) como aditivo, sobre PHBV comercial, que lleven a la obtención de una película biodegradable para el desarrollo de empaques con alta distribución y dispersión de los aditivos. Adicionalmente, con el objetivo de otorgarle a la película propiedades antimicrobianas, se estudió el potencial antimicrobiano de LEO contra el patógeno *Botrytis cinerea* de la fresa.

Finalmente, el interés en usar al PHBV como matriz principal radica en que este trabajo está ligado a un macroproyecto realizado en conjunto con la Universidad Industrial de Santander, donde se adelanta la producción a escala piloto de PHAs a partir del mucilago del cacao en un reactor de 100 L y el estudio de su viabilidad comercial. Adicionalmente, ya que el macroproyecto tiene como eje central el cacao y pensando en economía circular, se estudió el uso de películas de PHBV comercial para el almacenamiento de chocolate al 85 y 90 % de cacao. Teniendo como perspectiva futura el uso del PHB obtenido a partir del mucilago de cacao como material de empaque para el chocolate.

Objetivos

General

Desarrollar una película con propiedades mecánicas y fisicoquímicas adecuadas para el almacenamiento de productos agrícolas, y basada en polihidroxialcanoato (PHA), ácido poliláctico (PLA) y microcelulosa esterificada (MC-Est).

Específicos

- Desarrollar por extrusión una película de PHBV, PLA y microcelulosa esterificada MC-Est con alta hidrofobicidad.
- Estudiar las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de las películas PHBV/PLA/MC-Est.
- Estudiar las propiedades antimicrobianas del extracto de limoncillo como posible aditivo activo en un empaque de PHBV/PLA/MC-Est.

1. Consideraciones conceptuales

En este capítulo se describe la base de los materiales poliméricos biodegradables, sus principales características y propiedades, al igual que se resaltan las principales matrices poliméricas biodegradables que tienen un interés comercial en donde se resalta el poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) o PHBV como uno de los polímeros con mejores características, posteriormente se menciona el uso de refuerzos con otros biopolímeros como el poliácido láctico o PLA y la microcelulosa (MC). Posteriormente, se muestran las diferentes modificaciones químicas que se pueden realizar a la microcelulosa para mejorar sus propiedades en donde se enfoca en la reacción de esterificación por medio de acetilación con anhídrido acético.

*Por último, se menciona la importancia de aumentar el valor agregado de los empaques poliméricos biodegradables por medio de la adición de componentes activos, donde se destaca el uso de aceites esenciales por su potencial antimicrobiano. En este estudio se resalta el efecto del aceite esencial de limoncillo (LEO) contra el patógeno *Botrytis cinerea*, con el fin de explorar su uso como aditivo para empaques de almacenamiento de fresas (*Fragaria vesca*).*

1.1 Materiales compuestos biodegradables

Los polímeros sintéticos se utilizan ampliamente en diversas industrias debido a su versátiles propiedades mecánicas, térmicas y fisicoquímicas, además de su bajo costo. Estos se utilizan en aplicaciones como el envase y empaquetamiento, construcción, electricidad y electrónica, transporte, adhesivos y recubrimiento, medicina y la agricultura.² Una de las propiedades más destacadas de los polímeros sintéticos es su bajo costo de producción, lo que los hace económicamente viables para su uso a gran escala.⁴⁵ Además, presentan una alta relación resistencia/densidad mecánica, lo que proporciona durabilidad en diversas aplicaciones.⁴⁶ También tienen una alta resistencia a las sustancias químicas, lo que los hace adecuados para entornos en los que la exposición a agentes corrosivos es motivo de preocupación.⁴⁷ Estas características son de gran utilidad en diferentes aplicaciones como por ejemplo la fabricación de envases y empaques. Sin embargo, estas mismas propiedades los convierten en materiales poco susceptibles a degradarse en el medio ambiente; por ejemplo, las bolsas plásticas de polietileno (PE) y polipropileno (PP) pueden tardar hasta 500 años en descomponerse.⁴⁸ Como consecuencia de lo anterior, los residuos de los polímeros sintéticos se convierten en un problema a largo plazo, sobre todo en productos de un solo uso, los cuales generan una preocupación para la conservación del medio ambiente. Es por esto por lo que se han buscado nuevas alternativas entre ellas se encuentran los polímeros biodegradables.

Los biopolímeros son polímeros producidos por organismos vivos y que se derivan de recursos renovables.⁴⁹ Estos materiales se pueden procesar utilizando tecnologías convencionales, como extrusión, inyección, termoformado o soplado.⁵⁰ Una de las principales ventajas de los biopolímeros es su biodegradabilidad, que les permite descomponerse en moléculas más pequeñas por la acción de microorganismos; sin embargo, este proceso requieren de condiciones específicas de temperatura y humedad.⁵¹ Este proceso de biodegradación ocurre fuera de las células debido al elevado tamaño molecular y baja solubilidad de los polímeros, lo que impide su transporte hacia el interior celular, por lo cual las células excretan enzimas extracelulares que depolimerizan el material polimérico. Los productos finales de este proceso metabólico son agua, dióxido de carbono, materia orgánica y metano (en el caso de la biodegradación anaeróbica).⁵⁰

La biodegradabilidad de un polímero no está determinada por la fuente de la cual proviene, sino por la estructura química del polímero. En la Figura 1 se muestra una clasificación de los polímeros según la fuente y biodegradabilidad.

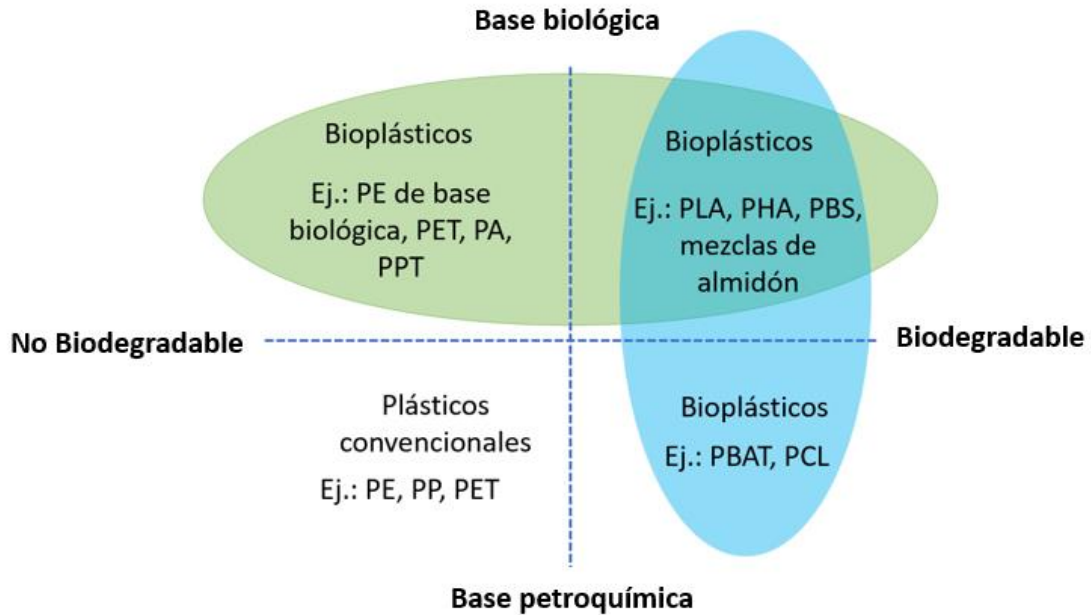


Figura 1. Clasificación de los polímeros según su fuente y biodegradabilidad.¹⁵

Existen una gran cantidad de biopolímeros los cuales se pueden clasificar según su fuente en tres grupos; los biopolímeros basados en recursos renovables (biomasa), los provenientes de monómeros bioderivados, y los sintetizados por microorganismos (Figura 2).⁵² En estos se resaltan el PLA y los PHAs (ejm. PHBV y PHB) como los biopolímeros con propiedades cercanas a las de los polímeros sintéticos y alta producción industrial .



Figura 2. Clasificación de biopolímeros según su origen.

1.1.1 Biopolímeros extraídos de microorganismos

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopoliésteres producidos bajo estrés nutricional por microorganismos en forma de gránulos intracelulares, los cuales son sintetizados como reserva de carbono y energía. Las cadenas de los PHAs son constituidos por la unión de monómeros hidroxiaácidos o mezclas de ellos, las cuales son producidos mediante fermentación de biomasa, siendo capaces de polimerizar y formar unidades tanto de hidroxibutirato como de hidroxivalerato.⁵⁰ Las propiedades de estos polímeros pueden variar dependiendo del tamaño de la cadena y de su ramificación, siendo el poli(hidroxibutirato) (PHB o PH3B) el más utilizado y estudiado de los PHAs.

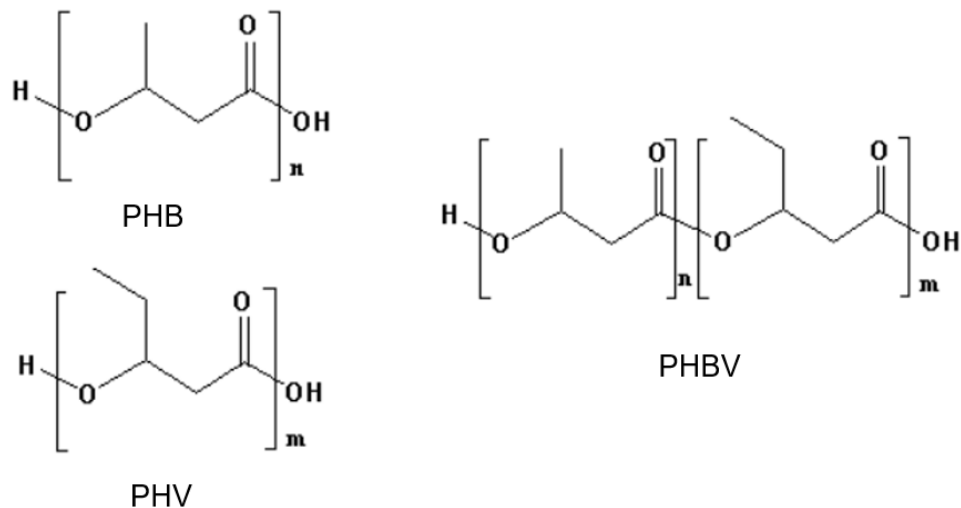


Figura 3. Estructura química del PH3B, PHV y PHBV.

El PHB es un polímero que exhibe una alta cristalinidad, lo que le confiere una alta rigidez y un punto de fusión, sin embargo, también le proporciona mayor fragilidad, y dificultad en el procesamiento. Para mejorar su flexibilidad y facilitar su procesamiento en estado fundido, el PHB se copolimeriza con 3-hidroxi valerato (HV). El resultado es el PHBV, un copolímero donde los grupos 3- hidroxibutirato y 3-hidroxi valerato se distribuyen de manera aleatoria (Figura 3).⁵³ La incorporación de grupos HV en este copolímero se traduce en un aumento en el alargamiento a la rotura, y una disminución del módulo de Young, la cristalinidad, la temperatura de fusión (T_m) y la temperatura de transición vítrea (T_g), como se puede apreciar en la Tabla 1. El PHBV se puede sintetizar químicamente; sin embargo, tiene un costo mayor que el producido por microorganismos. La síntesis bacteriana de PHBV se puede llevar a cabo incorporando co-sustratos al medio, tales como el ácido valérico, ácido propiónico, propanol propionato de sodio, ácido levulínico, ácido heptanoico, valerato, y aceites de oliva y girasol. No obstante, existen algunas especies bacterianas, que sin necesidad de agregar co-sustratos específicos son capaces de producir PHBV, como la *Haloferax mediterranei* y *Halomonas campisalis*.⁵⁴

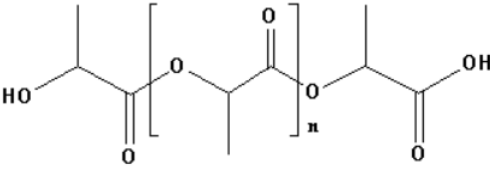
Tabla 1. Propiedades del poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) y poli (3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) (PHBV).

Propiedad mecánica	PHB ^{24 55}	PHBV(12%HV) ^{56 57 58}
Módulo elástico (MPa)	3000-3500	800-2380
Esfuerzo de rotura (MPa)	20-40	14-385
Deformación a la rotura (%)	5-10	1.4-3
Grado de cristalinidad (%)	50-60	9.61
T _m (°C)	165-175	150-180
T _g (°C)	5-9	-1.26

1.1.2 Biopolímeros obtenidos de monómeros bioderivados

El polímero más estudiado dentro de este grupo es el poliácido láctico (PLA), producido a partir de la polimerización por apertura de anillo de lactida o por policondensación del ácido láctico. El PLA es un poliéster termoplástico alifático biobasado, con excelente procesabilidad en estado fundido, resistencia a los aceites, alta transparencia y buena sellabilidad,^{23,53} propiedades deseables en el campo del envasado de alimentos (Tabla 2). Sin embargo, tiene algunos inconvenientes, como una alta fragilidad y permeabilidad al oxígeno, además de alta permeabilidad al vapor de agua.²³

Tabla 2. Propiedades del poliácido láctico (PLA).

Propiedad mecánica	PLA ⁵⁵	Estructura
Módulo elástico (GPa)	2.7-4.14	
Esfuerzo de rotura (MPa)	15.5-150	
Deformación de rotura (%)	20-30	
Grado de cristalinidad (%)	13.94	
T _m (°C)	170-200	
T _g (°C)	50-60	
Permeabilidad al oxígeno (cm ³ mm m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹)	60-80	
Permeabilidad al vapor de agua (g mm m ² atm ⁻¹ d ⁻¹)	150-190	

1.1.3 Compósitos de PHBV/PLA

Con el fin de mejorar las propiedades de procesamiento del PHBV, se ha estudiado el uso de otros biopolímeros que puedan servir de refuerzo, uno de los materiales más

destacados es el polímero láctico o PLA, el cual tiene un alto módulo de Young y ostenta una mayor transparencia que el PHBV. De ahí que se encuentren una gran variedad de estudios donde se estudian las mezclas PHBV/PLA (Tabla 3). Es importante resaltar, que el método de procesamiento puede variar las características del material producido, siendo las técnicas más utilizadas para la producción de compósitos a escala laboratorio la extrusión y *solvent casting*. La extrusión es un método por el cual se calienta el polímero hasta su estado fundido, luego se pasa a través de una boquilla, finalmente por medio de un dado se da forma al material y al salir de este se enfría el material con la forma deseada, ya sean hilos o películas, entre otros. Por otra parte, la técnica de *solvent casting* consiste en diluir el polímero en un solvente orgánico, posteriormente se vierte en un molde y el solvente se evapora dejando una película o material con la forma del molde.

Tabla 3. Estudios de las mezclas de PHBV y PLA.

Proporciones de PHBV/PLA	Propiedades estudiadas	Método de procesamiento	Conclusiones	Ref.
10/90, 20/80, 30/70 y 40/60	Estructura y morfología	Hilado por fusión y estirado en caliente	-Crecimiento cristalino del PLA -Disminución del módulo de elasticidad y alargamiento a la rotura con el aumento del contenido de PHBV.	59
80/20, 70/30, 60/40 y 50/50	Mecánicas y reológicas	Extrusión	-Aumento de la resistencia a la flexión y el módulo de elasticidad. -Aumenta la estabilidad térmica del PHBV	60
50/50, 30/70, 20/80 y 80/20	Morfología y reología	Hilado por fusión	-La viscosidad aumenta con la proporción de PLA.	61
90/10 a 10/90 con incrementos de 10% de PHBV	Morfología y propiedades físicas	Mezclado en fundido y moldeado por compresión	-La Temperatura de transición vítrea del PLA disminuye con el aumento de PHBV. La conductividad térmica aumentó con el porcentaje de PHBV.	62
20/80 y 35/75	Propiedades físicas	<i>Solvent casting</i> y extrusión	-Aumentan las propiedades de barrera al oxígeno y al vapor de agua.	63

Como se puede observar la Tabla 3, la adición de PLA a la matriz de PHBV mejora sus propiedades mecánicas, térmicas y reológicas. Por otra parte, en lo que respecta a las propiedades de barrera, se ha encontrado estudios donde se adiciona PHBV a las películas

de PLA, dado que el PLA tiene propiedades de barrera más deficientes que el del PHBV.⁶³ Sin embargo, el estudio de las propiedades de barrera del PHBV con la adición de PLA no se ha reportado. Por lo cual, es de gran interés observar el comportamiento de la mezcla de PHBV/PLA, siendo el PHBV el componente mayoritario o si se encuentran en igual proporción.

Es importante resaltar que las propiedades obtenidas de los compósitos de PHBV/PLA se ven afectadas por la homogeneidad y compatibilidad de la mezcla. Esta última se puede promover con la adición de aditivos, los cuales buscan mejorar la interacción entre los polímeros presentes en la mezcla, además de servir como refuerzo mecánico del material. Es así, que se han utilizado como refuerzos del PHBV algunas fibras naturales como la microcelulosa, fibras de cáñamo, madera, ortiga, paja de arroz, entre otras;⁶⁴ y nanomateriales como el grafeno, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, nanocelulosa, nanoarcillas y nano metales.⁶⁵

1.2 Celulosa como refuerzo

El uso de celulosa como refuerzo de PHBV ha generado una gran variedad de estudios, en los cuales se revela su aporte a las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera (Tabla 4). En estos se resalta el uso de la nanocelulosa (NC) y fibras de celulosa, en el primer caso se debe a su tamaño de partícula, alto módulo elástico, estabilidad dimensional, y bajo coeficiente de expansión térmica. Encontrando que las propiedades optimas de PHBV se presentan con la adición del 1% de NC.⁶⁵ En otros estudios se ha mostrado que la adición de NC en un 0.25 % mejora la adhesión interfacial entre el PLA/PHBV, mejorando las propiedades mecánicas, morfológicas y de barrera.⁶⁶ Por otra parte, las fibras de celulosa, como la del cáñamo, paja de arroz, paja de trigo, han demostrado aumentar el módulo elástico en un 20% y un aumento en la resistencia a la tracción de un 50%.⁶⁷

Tabla 4. Estudios de mezclas de PHBV, PLA y aditivos.

Proporciones de PHBV-PLA	Propiedades estudiadas	Método de procesamiento	Conclusiones	Ref.
10:90 y 20/80 NC recubierta	Térmica y morfología	Moldeo por inyección	Se aumenta la cristalinidad del PLA	53
30:70 NC	Morfología, estructura, mecánicas y barrera	<i>Solvent casting</i>	Mejora las propiedades mecánicas y barrera al oxígeno	66
30:70 con fibras de celulosa	Mecánicas	Extrusión	Disminuye la rigidez y aumenta la resistencia a la tracción	67
0:100, 15:85, 30:70, 45:55 y 100:0 con nanoarcillas	Térmicas, mecánicas, reológicas y morfológicas	Extrusión	Aumento del módulo de elasticidad. -Mejora la cristalinidad PHBV	68
75-25 con partículas de paja de arroz y PEG400	Mecánicas, térmicas y barrera	<i>Solvent casting</i> mezclador de rodillos	Mejora la permeabilidad al vapor de agua	69
30/70 con adición de 7% de MC	Propiedades térmicas	<i>Solvent casting</i>	Disminución de la cristalinidad y estabilidad térmica de la matriz	70

Por su parte, no se han encontrado estudios del uso de NC como refuerzo en películas de PHBV/PLA procesadas mediante extrusión. La mayoría de los estudios se basan en procesamientos a través de *solvent casting* o moldeo por inyección. Esto podría atribuirse al estado acuoso en el que se encuentra la NC y a su naturaleza hidrofílica, lo cual complica su uso por extrusión, y disminuye su dispersión y distribución en las películas de PLA y PHBV. Este fenómeno se debe a que los enlaces de hidrogeno intra e intermoleculares que se encuentran en los cristales de NC tienden a formar aglomeraciones en presencia de polímeros polares como el PLA.⁵³

Teniendo en cuenta lo anterior, se han reportado diferentes estrategias para aumentar la dispersión y la estabilidad térmica de la NC en matrices de PLA y PHBV, por medio de la acetilación de la NC con anhídrido acético. En este estudio se obtuvo que una matriz de PHBV con 1.2% de NC acetilada aumenta un 44.7 % y 34.5% la resistencia a la flexión y el módulo de flexión comparados con el PHBV solo.⁷¹ En otro estudio se encontró que la adición de NC acetilada puede disminuir del 58.1% a 39.1 % la cristalinidad del PHBV,

aumentar la temperatura máxima de descomposición de 259.6°C a 266.3°C, y el ángulo de contacto de 60.1° a 95.7°, haciendo las películas más hidrofóbicas.⁷² Cabe destacar que la mayoría de estos estudios se han realizado por medio de *solvent casting*, debido a las condiciones en las que se encuentra la NC (en medio acuoso).

1.2.1 Funcionalización de microcelulosa

Teniendo en cuenta los problemas que presenta a NC, algunos autores han sugerido el uso de microcelulosa (MC). Por lo cual hacer una funcionalización o derivatización de la microcelulosa (MC) puede llevar a disminuir su carácter hidrofílico y aumentar su afinidad química con las matrices poliméricas en las cuales se use como aditivo. Este proceso se puede hacer aprovechando la reactividad de los grupos hidroxilo presentes en cada monómero de la celulosa, de manera que el hidrogeno sobre el hidroxilo se reemplace por funciones químicas menos polares o con menor probabilidad de hacer puentes de hidrogeno intermolecular. Para lograr esto se han reportado reacciones orgánicas comunes entre las cuales está la amidación, acilación y esterificación.⁷³ En esta última, la reacción se puede llevar a cabo con ácidos orgánicos de longitud de cadena variante, entre los que se pueden utilizar el ácido acético, propiónico, butírico, hexanoico, entre otros.²⁹ Con lo cual se espera modular el grado de hidrofobicidad que adquiere la celulosa derivatizada. Este proceso también se puede llevar a cabo usando derivados de ácido carboxílicos tales como los anhídridos y cloruros de ácido, con el fin de aumentar la eficiencia de la reacción. La funcionalización por esterificación o acetilación generalmente usa como mecanismo de reacción la acetilación de Fisher, donde el número de hidroxilos acetilados se puede estimar por medio del grado de sustitución (GS), que se define como el numero promedio de grupos éster unidos covalentemente por unidad de anhidroglucosa (UAG). En la Figura 4, se encuentra el mecanismo de la reacción de esterificación sobre una unidad anhidroglucosa, por lo tanto, se obtendría un grado de sustitución de uno.

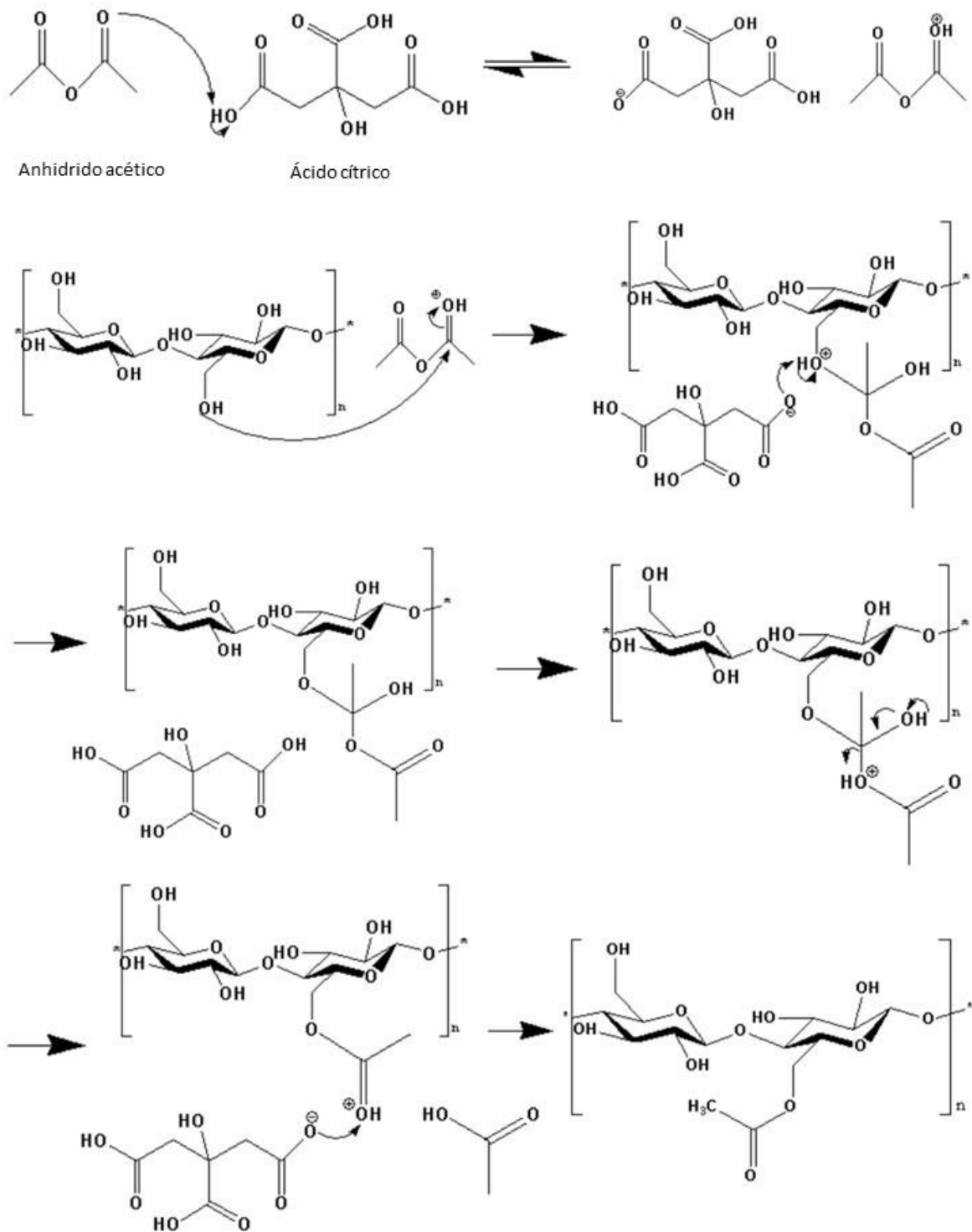


Figura 4. Mecanismo de reacción de la acetilación de celulosa con anhídrido acético, y ácido cítrico como catalizador.

Varios autores han reportado que la adición de MC acetilada a películas de PLA, aumenta el módulo de corte y el esfuerzo a la ruptura, lo cual significa un aumento en la rigidez del material.⁷⁴ También se ha encontrado una disminución de la permeabilidad del material al vapor de agua.³³ Por otra parte, la adición de 1.2% de fibras de celulosa acetilada a una matriz de PHBV resulta en un notable incremento del 44.7% en la resistencia a la flexión y del 34.5% en el módulo de flexión.³² Sin embargo, es relevante destacar que no se han encontrado referencias sobre el empleo de MC acetilada como refuerzo para el PHBV o la mezcla PHBV/PLA. Por lo tanto, la investigación en este ámbito adquiere una importancia significativa.

1.3 Extractos de aceites volátiles como agentes activos en empaques

Los aceites esenciales son en su mayoría metabolitos secundarios de las plantas, y están implicados en sus relaciones ecológicas. Estos aceites se componen en su mayoría de monoterpenos y sesquiterpenos, como también de compuestos oxigenados tales como fenoles, aldehídos, cetonas, esteroides, entre otros. Compuestos de gran utilidad debido a sus propiedades terapéuticas, antioxidantes, y antimicrobianas.⁷⁵ Por lo anterior, los aceites esenciales se han tratado de implementar como aditivos en empaques activos, especialmente para la industria de alimentos, con el fin de proporcionar inocuidad al alimento, extender la vida útil manteniendo la calidad, seguridad y propiedades organolépticas del producto.⁷⁶ Al hacer una revisión tecnológica de los aceites esenciales utilizados en películas biodegradables se encuentran una gran variedad de fuentes vegetales (Tabla 5).

Tabla 5. Búsqueda estratégica aceites esenciales.

Aceite Esencial	Acción	Matriz polimérica	# artículos relacionados
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Antimicrobiana Antioxidante	PHA/PLA, PLA, PHA, PHBV, celulosa bacteriana, acetato de celulosa, pectina, alcohol polivinílico, quitosano y PBAT.	300
Romero (<i>Rosemarinus officinalis</i>)	Antimicrobiano	Quitosano, NC, polietileno, PLA, alginato, polietileno, acetato de polivinilo (PVA), gelatina y pectina.	158
Menta (<i>Mentha</i>)	Antimicrobiana antifúngica	Quitosano, gelatina, alcohol polivinílico, PLA, seda elastina, carboximetilcelulosa-gelatina y almidón.	63
Limoncillo (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Antibacteriano	Alginato de sodio, almidón, poli(estireno), quitosano, PLA y PVA-almidón	86
Citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>)	Antimicrobiana	Levan/bentonita, alginato, quitosano, PHB, gelatina y polipropileno	26
Salvia (<i>Salvia officinalis</i>)	Antimicrobiana Antioxidante	Quitosano, PLA, pectina, Policaprolactona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa, almidón y celulosa	21

* Búsqueda realizada el 6 de diciembre 2023, en las bases de datos de usando las palabras clave: *packaging, oil, oregano, peppermint, lemongrass, citronella, sage, pathogens*.

Como puede observarse en la Tabla 5, los aceites esenciales que han despertado mayor interés investigativo en empaques activos son el orégano, romero y limoncillo. De estos, el limoncillo ha mostrado un alto potencial activo contra la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), hongo que ataca a una gran cantidad de frutas y verduras, entre las que se encuentran principalmente las bayas (la fresa, mora, uchuva, arándanos, uvas, entre otros). Por esta razón, se ha explorado el uso de aceite esencial de limoncillo como potencial aditivo en el envasado de estas frutas, ya que además de lo antes mencionado, al compartir similitud en olor con las frutas, su naturaleza cítrica favorece compatibilidad con las propias esencias de productos frutales. Esto contrasta con los aceites de orégano y menta, los cuales, en estudios con frutas y verduras, se perciben como contaminantes, ya que su aroma puede interferir con las características organolépticas del producto empacado.

Respaldando esta idea, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el aceite esencial de limoncillo no contamina el producto empacado pero si tiene actividad antimicrobiana

contra *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Penicillium*, encontrando que a partir de dosis entre 300 ppm y 1500 ppm se tiene actividad antimicrobiana.⁷⁵ Dentro de los anteriores patógenos se debe resaltar que el hongo *Botrytis cinerea* puede producir pérdidas anuales de entre 10 y 100 billones de dólares, ya que afecta entre el 20 y 60% de la producción de uvas, fresas, tomates, moras, y frutas de pepa (manzanas, pera, duraznos y ciruela).⁷⁷ Esto ha llevado a que se estudie con especial interés el efecto antimicrobiano del aceite esencial de limoncillo (LEO) contra este hongo, estimando una concentración inhibitoria del 90% o IC90 de 95 $\mu\text{L/L}$ en 7 días y 125 $\mu\text{L/L}$ en 14 días en fase vapor para algunas cepas de *Botrytis cinerea* en fresa. Además se encuentra que con concentraciones de 125 $\mu\text{L/L}$ las propiedades organolépticas de la fresa permanecen aceptables, contrario a lo obtenido con otros aceites como el de tomillo o pimienta.⁷⁸ También se han encontrado estudios *in vitro* e *in situ* en los cuales el LEO en concentraciones ≥ 250 $\mu\text{L/L}$ pudo suprimir el crecimiento de *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium expansum*, *Micrococcus luteus*, y *Serratia marcescens* en zanahoria.⁷⁹

1.3.1 Aceite de limoncillo

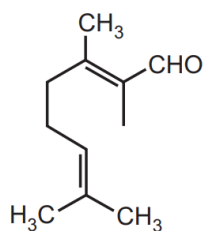
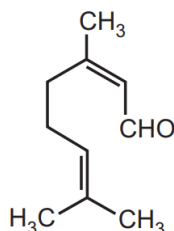
El limoncillo o limonaria (*Cymbopogon citratus*) es una hierba perenne, constituida por numerosos tallos rígidos que crece alrededor de 1.5 m, cultivada en centro y sur América, África, Sudeste Asiático y las islas del Océano Indico.⁸⁰ El aceite esencial de esta planta es altamente utilizado en la industria de los aromas, fragancias, cosméticos, perfumería, productos farmacéuticos, entre otros. En la Tabla 6 se muestran los principales componentes del LEO, y su presencia en algunas muestras comerciales según el país de origen. Por otra parte, también se muestra la composición de LEO obtenido por medio de hidrodestilación y por extracción con dióxido de carbono supercrítico (SFE).

Tabla 6. Composición del aceite de limoncillo (LEO)⁸⁰.

Componente	Comercial Sur África	Comercial Grecia	Hidrodestilación China	Hidrodestilación Kenia	SFE CO ₂
Geranial	48.14	38.6	15.12	39.53	20.02
Neral	38.32	28.7	11.15	33.31	15.11
Citronelal	0.34	0.6	12.77	0.12	12.57
D-Limoneno	0.18	6.9	0.20	-	3.55
Geraniol	1.34	4.4	9.39	3.05	6.34
Acetato de geranilo	0.82	-	2.24	0.24	0.65
β-cariofileno	0.17	1.4	1.86	0.15	0.10

*SFE CO₂: Extracción con dióxido de carbono (CO₂) supercrítico.

Lo anterior muestra que el geranial (α -citral), neral (β -citral) y geraniol son los principales componentes de LEO (Figura 5), donde su proporción puede variar dependiendo de la región geográfica, clima, época del año y el método de extracción utilizado, como se puede observar en la Tabla 6. Interesantemente, los estudios muestran que el citral es el compuesto con mayor actividad antimicrobiana, sin embargo, también se ha observado que los otros componentes del LEO pueden tener un efecto sinérgico que aumenta el potencial antimicrobiano del citral.

Geranial (α -citral)Neral (β -citral)

Geraniol

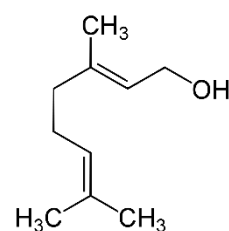


Figura 5. Estructuras de los principales compuestos de LEO geranial (α -citral), neral (β -citral) y geraniol.

Por esto, el LEO ha llamado la atención como probable aditivo en empaques activos para alimentos debido a que tiene varios compuestos antimicrobianos. A continuación, en la Tabla 7, se muestran algunos estudios donde se ha implementado en matrices poliméricas.

Tabla 7. Matrices poliméricas con inclusión de LEO

Matriz polimérica	Alimento	Resultados	Referencia
Encapsulación en ciclodextrina	Fresas	Efecto bacteriostático en <i>Aspergillus niger</i> y <i>Botrytis cinérea</i>	42
PHB/PLA	Fresas	Empaques de PLA-PHB-LEO 5% ralentizó el proceso de maduración, mantuvo la integridad de la pared celular de la fruta, y redujo la pérdida de humedad, provocando menores pérdidas de peso y llevando a una mayor vida útil y fresca de la fresa.	44
Alginato de sodio- Quitósano	Granada	Se requiere 15 µL/mL y 30 µL/mL de LEO para inhibir completamente la germinación de esporas de <i>Botrytis Cinerea</i> y <i>Penicillium spp.</i> Reduciendo la gravedad de descomposición en el fruto.	81
Alcohol polivinílico (PVA) con nanotubos de haloisita y NC.	Papaya	Se extendió la vida útil 14 días a 25°C y humedad relativa de 80-85%.	82
Recubrimiento de zeína de maíz	Lubina rayada	Se utilizó la adición de LEO en recubrimientos de lubina rayada híbrida cultivada y fresca contra <i>L. monocytogenes</i> .	83
Quitósano/celulosa	Tomate	1 %(p/v) de LEO en el recubrimiento mostró un porcentaje de inhibición en el diámetro de la lesión de 34.46 - 57.44% contra <i>Botrytis cinerea</i> .	84

Dentro de lo mostrado en la Tabla 7 es importante destacar el trabajo realizado por Rusková,⁴⁴ quien reporta que al implementar 5% de LEO en un empaque polimérico de PLA/PHB 80/20 con fresas, después de 18 días de almacenamiento se obtiene mejores características de textura, aroma, dulzor, acidez y sabor comparadas a los controles, demostrando que la adición de LEO mantiene las propiedades organolépticas de la fresa en almacenamiento.

1.4 Principales empaques en el mercado agrícola

La industria de empaques utiliza una gran variedad de polímeros, los cuales proporcionan diferentes propiedades que ayudan a mantener al producto empacado en condiciones adecuadas para su transporte, almacenamiento y distribución. Los principales polímeros utilizados en esta industria (Figura 6) son el polietileno de baja densidad (PE-LD), polietileno de media y alta densidad (PE-ME y PE-HD, respectivamente), polipropileno (PP), polietileno tereftalato (PET), policloruro de vinilo (PVC), poliestireno (PS) y poliamida (PA).

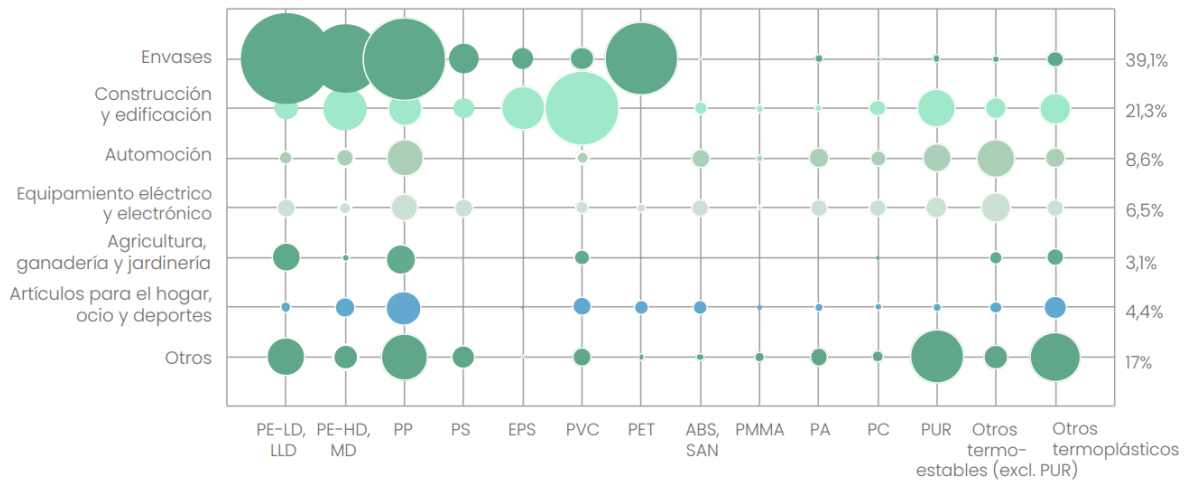






Figura 6. Demanda de plástico por aplicación y tipo de polímero 2022.⁸⁵ Donde, PS es poliestireno, EPS poliestireno expandido, ABS acrilonitrilo butadieno estireno, PMMA Polimetilmetacrilato, PC policarbonato y PUR poliuretano.

En Colombia se destacan el PP para empaques rígidos como los utilizados en las canastillas de uchuva, el PET utilizado en canastillas de fresas, uchuvas y arándanos, y por último el PE-LD y PA, los cuales son utilizados en empaques flexibles por ejemplo para exportar gulupa. Entre los dos últimos, se resalta el PA, el cual, a pesar de su alto costo, pero excelentes propiedades de barrera, tiene una gran importancia en la agroindustria. En la Tabla 8, se encuentran las principales propiedades de estos polímeros.

Tabla 8. Propiedades mecánicas y de barrera de polímeros usados en empaques de la agroindustria.

	PP ^{55,86,87,88}	PET ^{55,86,88}	PE-LD ^{55,87,88}	PA ^{86,87,88}
Aplicación				
Módulo elástico (GPa)	1.95	9.35	0.26-0.5	25
Esfuerzo máximo (MPa)	31-45	62	30	34
Elongación a la ruptura (%)	50-145	230	200-600	800
Grado de cristalinidad (%)	42.6-58.1	7.97	25-50	31-40
Temperatura de fusión (°C)	160-169.1	260	115	210-220
Temperatura de transición vítrea (°C)	-20- -5	67-81	-130-100	45
Coefficientes de permeabilidad al vapor de agua (g mm m ² atm ⁻¹ d ⁻¹)	20-36	13-26	36-52	105-392
Coefficiente de permeabilidad al oxígeno (cm ³ mm m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹)	80-95	2-3	190-200	1-5

En conclusión, biopolímeros como el PHBV y el PLA tienen un alto atractivo para su uso en la industria de envase. Sin embargo, se requieren estudios acerca de los cambios en las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera en el PHBV cuando este hace parte de una mezcla, con el fin de establecer la composición más apropiada para empaques flexibles y para empaques rígidos. Adicionalmente, teniendo en cuenta la información consultada se puede destacar la falta de información sobre el uso de MC como refuerzo en películas de PHBV y PHBV/PLA, lo cual brinda una oportunidad de estudio, donde la búsqueda de propiedades adecuadas para el empaque de productos agrícolas es fundamental.

2. Metodología experimental

En este capítulo se detallan los materiales utilizados para la derivatización de la microcelulosa (MC) su caracterización posterior, la obtención y caracterización de las láminas compuestas de PHBV, PLA y MC, y la obtención, análisis del efecto inhibitorio tanto in vitro como in vivo del aceite de limoncillo como aditivo preservante.

Inicialmente, se describe el proceso experimental empleado para la obtención de la microcelulosa acetilada, al igual que se describe la metodología utilizada para la posterior optimización y escalado del proceso de acetilación. Luego, se muestra la metodología para la determinación del nivel de acetilación o grado de sustitución (GS).

Después, se describen los métodos utilizados para la obtención y la caracterización de las láminas compuestas de poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato/ poliácido láctico (PHBV/PLA) y poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato/ poliácido láctico/ microcelulosa esterificado PHBV/PLA/MC-Est. También se muestra los métodos utilizados en el estudio preliminar de desempeño de las láminas de PHBV obtenidas para evaluar si alteraban las propiedades sensoriales de un producto con alto contenido de lípidos como chocolate. Este ensayo, como se detalló anteriormente, forma parte del macroproyecto UIS-UNAL, cuyo objetivo es la producción de polihidroxi butirato (PHB) a partir de biomasa residual de la producción de cacao. La finalidad es integrar este PHB en un envase que, a su vez, se utilizará para la comercialización de chocolate, generando así un valor agregado al chocolate producido en Colombia.

Posteriormente se describen los métodos utilizados para la extracción e incorporación del aceite esencial de limoncillo (LEO) como aditivo en la matriz polimérica. Así mismo, se mencionan las pruebas in vitro e in vivo empleadas para estudiar el carácter antimicrobiano del aceite esencial ante el hongo Botrytis cinerea de la fresa (Fragaria

vesca) y evaluar qué efectos tendría si se utiliza a la par con una lámina compuesta de PHBV/PLA/MC para su aplicación en un empaque para fresas.

2.1 Insumos

Los insumos utilizados fueron; PHBV referencia DAN 02198 ($M_n=42000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) adquirido de Danimer Bioplastics® (Bainbridge, GA, USA) con un $PDI=1,10$, temperatura de fusión de 128-145°C. El PLA referencia Luminy® LX175 (96% L-isómero) fue comprado a Corbion (Ámsterdam, Países Bajos), densidad $1,24 \text{ g/cm}^3$, temperatura de fusión de 155°C y temperatura de transición vítrea entre 55-60°C. La microcelulosa (MC) utilizada fue adquirida bajo el nombre comercial de “celulosa microcristalina” de la empresa Profinas SAS (extraída de madera y producida en Cali, Colombia). El chocolate utilizado en las pruebas sensoriales fue suministrado por el Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales de la Universidad Industrial de Santander.

El cloroformo (99,8%) fue estabilizado con etanol, N,N-dimetilformamida y ácido acético para el proceso de *solvent casting*. Todos estos reactivos fueron obtenidos de AppliChem. Los reactivos empleados en la acetilación; anhídrido acético, ácido cítrico y etanol se adquirieron de Sigma Aldrich®.

El aceite esencial de limoncillo comercial (LEO-Co) fue obtenido de DOTERRA (Bogotá, Colombia), y la planta de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) empleada en las extracciones se obtuvo de la plaza de mercado Samper Mendoza de la ciudad de Bogotá. La cepa de hongo *Botrytis Cinerea* código LPNV8 fue adquirida del laboratorio de Productos Naturales Vegetales del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Las pruebas de actividad biológica se llevaron a cabo en agar de dextrosa de patata (PDA) de Sigma Aldrich®. Por último, las fresas (*Fragaria vesca*) fueron compradas en la plaza de mercado Paloquemado de la ciudad de Bogotá.

2.2 Esterificación de microcelulosa

2.2.1 Reacción de esterificación de microcelulosa

La esterificación de la MC por medio de acetilación siguiendo otros estudios de la literatura.³⁰ Las reacciones se llevaron a cabo en un matraz de fondo redondo de 50 mL equipado con un condensador y un agitador magnético, añadiendo todos los reactivos al matraz y calentando el sistema hasta la temperatura de reacción establecida. Esta mezcla se dejó reaccionar por el tiempo seleccionado, manteniendo la agitación permanente. Para

la reacción se utilizó una proporción de catalizador (ácido cítrico) /MC de 0.6 p/p y una proporción de MC/ agente de acetilación (anhidrido acético) de 0.01 p/v

Terminada la reacción de acetilación se hizo una filtración al vacío de la microcelulosa acetilada (MC-Est) obtenida y se realizó su limpieza por medio de 3 lavados con 20 mL etanol y 4 lavados con agua destilada, para finalmente secar el sólido producido en un horno a 50 °C por 24 h.

Teniendo en cuenta el interés de este trabajo por llevar todos los materiales producidos a que hagan parte del spin off Actipack,^{1*} posteriormente se realizó un escalado de 0.7 g a 5 g de MC, realizando la reacción a tres temperaturas (100, 120 y 140 °C) y tres tiempos (3, 8 y 24 h), esto con el fin estudiar el efecto de estas variables en la reacción y adicionalmente para obtener MC-Est suficiente para realizar el proceso de extrusión de las películas. Durante este escalado se varió el método de limpieza debido a las altas cantidades de etanol utilizadas y la duración de la filtración. Para el caso de 5 g de MC, se dejó decantar la muestra por alrededor de 4 horas observando la separación de la MC-Est del líquido, haciendo más sencillo el retiro de la mayoría de líquido sobrenadante por decantación tras lo cual se adicionó etanol y se colocó a agitar con alrededor de 5 min, N para nuevamente dejar precipitar la MC-Est y retirar el líquido presente. Este proceso se hizo dos veces con etanol y tres con agua destilada caliente. Es importante resaltar que esta metodología de limpieza se utilizó posteriormente para el escalado a 50 g y 100 g, con resultados satisfactorios. Finalmente, se realizó una optimización del agente acetilante variando la proporción MC/anhidrido acético entre 0.1, 0.14, 0.33 y 0.50%. Esto con la intención de usar la menor cantidad de anhidrido acético posible, ya que este reactivo está en el listado de químicos controlados por parte del gobierno nacional, lo cual podría ser una limitante extra en la operación de escalado del proceso.

^{1*} Antipack es el nombre de la iniciativa empresarial o spin-off enfocado en el desarrollo de envases para productos agrícolas. Surgió a través de la colaboración entre Agrobol S.A. (empresa privada Colombiana) y la Universidad Nacional de Colombia, estableciendo una sinergia entre la industria y la academia con el propósito de capitalizar el conocimiento científico, técnico y creativo en aplicaciones para la industria.

2.2.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para la MC y MC-Est, antes de tomar los espectros de transmisión FTIR, se molieron 2.5-4.5 mg de cada muestra y se mezclaron con 200-250 mg de KBr en un mortero de ágata.⁸⁹ A partir de esta mezcla, se prepararon tabletas por medio de una prensa mecánica.

Los espectros infrarrojos de la MC y MC-Est fueron tomados usando un espectrofotómetro Shimadzu IR Prestige-21 a temperatura ambiente en la región de 4000-600 cm⁻¹ con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) y punta plana, analizando tanto las películas obtenidas por *solvent casting* como por extrusión.

2.2.3 Determinación del grado de sustitución (GS) por medio de espectroscopia infrarroja (FTIR)

El GS fue calculado con la Ecuación 3.^{89,90} por medio del análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), con una normalización del área de los picos de absorción del grupo éster en 1736 cm⁻¹ (a_{1736}) respecto al área del pico referente al enlace C-O-C de absorción en 1162 cm⁻¹ (a_{1162}). Valor de GS que representa el número de esteres por unidad de repetición de celulosa.

$$GS = \frac{a_{1736}}{a_{1162}} \quad \text{Ecuación 3}$$

2.2.4 Ensayo de hidrofobicidad por medición del ángulo de contacto

La medición indirecta de la hidrofobicidad de las muestras de MC y MC-Est se realizó según la norma ASTM D7490: Método de prueba estándar para medida de la tensión superficial usando ángulos de contacto.⁹¹ El análisis se realizó por triplicado a 20°C, utilizando agua destiladas en un goniómetro de fabricación propia, el cual está en proceso de patente. Para la MC y MC-Est se realizaron placas por medio de compresión partiendo de 5 g de muestra. A cada una de las muestras se les depositó una gota de 10 µL sobre la superficie de la placa, dejando un tiempo de equilibrio de 30 segundos antes de medir el ángulo de contacto de la gota con la superficie.

2.2.5 Molienda y tamizaje de la MC

Con el fin de aumentar la dispersión y distribución de la MC-Est en la matriz PHBV/PLA durante el proceso de extrusión, se disminuyó el tamaño de partícula de la MC y MC-Est por medio de un molino de bolas de material cerámico. Se realizaron cargas en lotes de 200 g moliendo por 20 min y posteriormente pasando por un tamiz malla 400 (con tamaño de apertura de 0.038 mm). Posteriormente, el material con tamaño de partícula superior a 0.038 mm se volvió a moler y se incorporó al material tamizado previamente.

Este proceso se realizó con el fin de comparar si hay mejora en la hidrofobicidad, entre moler y acetilar la MC antes de la funcionalización o después de la reacción. Por lo cual, se utilizó el proceso de molienda y tamizaje a las muestras de MC y MC-Est.

2.2.6 Análisis de tamaño de partícula

El tamaño de partícula de la MC y MC-Est se obtuvo por medio de un analizador de tamaño de partícula laser PSA 1190 Anton Paar (rango de medición de seco 0.1 μm a 2500 μm .) con una presión en aire de 200 bar y una frecuencia de vibración de 30 y 40 Hz. Este se realizó por triplicado con muestras de aproximadamente 2 g.

2.3 Obtención de matrices poliméricas

2.3.1 Solvent casting de películas PHBV/PLA

Para la metodología de *solvent casting*, se utilizó una mezcla PHBV/PLA que mantuviera siempre una concentración polímero/solvente de 18% p/v, con el fin de conseguir películas de espesor y rigidez apropiadas para el empaque de alimentos como considerable. En este proceso de estudiaron tres solventes, cloroformo, dimetilformamida (DMF) y ácido acético. Con el primer solvente se vertieron las diferentes proporciones en un recipiente con cloroformo bajo agitación constante a una temperatura de 40°C, y durante 2 horas, obteniéndose disolución completa, evitando la evaporación del solvente mediante un calentamiento con reflujo. Luego, la solución de PHBV/PLA en cloroformo se puso en un recipiente de vidrio de 200 mL, y se dejó por 48 horas, permitiendo la evaporación del

solvente hasta la formación de una película homogénea, la cual finalmente se secó por 24 horas en una estufa a 50°C.

Cuando se usó como solvente el DMF la mezcla PHBV/PLA-solvente se agitó a 116°C por una hora, para posteriormente sónica por 30 min y verter en un recipiente de vidrio precalentado a una temperatura de 80°C, obteniendo una película que se secó en un horno a 80°C por 12 h. Por último, las películas realizadas utilizando ácido acético se realizaron calentando la mezcla PHBV/PLA-solvente a 100°C con agitación constante por una hora, para posteriormente verter la solución en moldes precalentados a 100°C, los cuales se secaron en un horno a 120°C por 10 min y luego a 40°C por 24 h.

2.3.2 Extrusión de películas PHBV/PLA

El proceso de extrusión se realizó con pellets de PHBV y PLA previamente secados en un horno a 50°C durante 72 horas. Teniendo en cuenta las proporciones establecidas de PHBV y PLA, los pellets secos se mezclaron manualmente y luego se llevaron a una co-extrusora BKLAB28, (Industrias Bimek, Bogotá-Colombia) con dimensiones de tornillo de diámetro de 2 pulgadas, una relación longitud/ diámetro de 25 y velocidad de 40 rpm. Manteniendo un perfil de temperaturas desde la tolva hasta el dado de 175-190-200-200°C.

2.3.3 Extrusión de películas PHBV/PLA/MC-Est

Para la extrusión de las películas PHBV/PLA/MC-Est se emplearon dos metodologías. En la primera, se llevó a cabo el mezclado manual de pellets de PHBV y PLA, ambos previamente secos, con MC-Est en polvo. Posteriormente, la mezcla se introdujo en la tolva y se procedió con la extrusión. En la segunda metodología, se crearon láminas de PHB/MC-Est en proporciones de 80/20 y 60/40 mediante el método de *solvent casting*, las cuales posteriormente fueron cortadas usando un molino de cuchillas formando así un peletizado de esta combinación. Luego, la mezcla de pellets de PHBV/MC-Est, PHBV y PLA previamente seca se incorporó en la extrusora. Esta metodología se implementó con el objetivo de mejorar la dispersión y distribución de MC-Est en la matriz de PHBV/PLA.

Las proporciones de PHBV/PLA/MC-Est obtenidas en las dos metodologías fueron de PHBV/PLA 50/50 con adición de 0.5%, 1%, 1.5% y 2% de MC-Est. La extrusión se realizó en la co-extrusora mencionada con anterioridad.

Las películas obtenidas tanto por *solvent casting* como por extrusión se caracterizaron por medio de ensayos de tensión deformación, absorción al agua, hidrofobicidad, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), permeabilidad al vapor de agua, transmitancia luminosa, estereoscopia, análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

2.4 Técnicas de caracterización de las láminas.

2.4.1 Ensayo de tensión – deformación

Siguiendo la norma ASTM D882: Ensayo de tracción para láminas plásticas delgadas,⁹¹ se prepararon probetas de las películas PHBV/PLA en las diferentes proporciones con dimensiones de 1 mm x 10 mm x 100 mm. Aunque la norma ASTM D882 pide el uso de probetas con espesor entre 0.25 - 1 mm, en este trabajo se obtuvieron algunas probetas de 1.15 – 1.5 mm, especialmente en películas realizadas por *solvent casting*. Esto, considerando que este último espesor es el generalmente usado por la industria colombiana en empaques rígidos para alimentos frescos (canastillas).

Para los ensayos, se utilizaron 5 probetas de cada una de las mezclas PHBV/PLA/MC-Est, iniciando con velocidad de ensayo de 12.5 mm/min, que es la recomendada para polímeros con baja deformación como el PLA y PHBV. Sin embargo, dado que las probetas presentaban tiempos de falla superiores a 10 minutos, se ajustó la velocidad a 50 mm/min, el cual se utiliza para materiales con deformaciones moderadas.

2.4.2 Ensayo de absorción al agua

El análisis de absorción de agua calcula el porcentaje de agua absorbido por una película polimérica en un tiempo determinado, y se llevó a cabo siguiendo la norma ASTM D570: Método de prueba estándar para la absorción de agua en plásticos.⁹¹ Este método para películas plásticas establece una geometría específica para las probetas a usar, donde el espesor está dado por las condiciones de la película. Para esto, las piezas de ensayo (24.4 mm x 7.62 mm) se secaron en un horno a 50°C durante 24 horas; se midieron y se pesaron con una precisión de 0.001 mm y 0.01 mg. Posteriormente, se colocaron en recipientes cerrados llenos de agua destilada durante 315 h a temperatura ambiente (17°C), se sacaron a tiempos de 24, 72, 138 y 315 horas, durante los cuales se limpió la superficie de

las muestras con papel secante, y se volvieron a pesar y medir. El aumento de peso se calculó como el porcentaje según la Ecuación 4.

$$WA(t, (\%)) = \frac{W(t) - W_0}{W_0} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde, $WA(t)$ es la absorción de agua en el tiempo t , W_0 es el peso inicial de la muestra (en $t=0$) y $W(t)$ es el peso de la muestra en un tiempo de inmersión t , en este caso t es 24 horas.

2.4.3 Ensayo de hidrofobicidad por medición del ángulo de contacto

La medición indirecta de la hidrofobicidad de las películas PHBV/PLA se realizó según la norma ASTM D7490.⁹¹ El análisis se realizó por triplicado a 20°C, utilizando agua destilada en un goniómetro, se tomaron láminas de 8 cm x 8 cm. A cada una de las muestras se les depositó una gota de 10 μ L sobre la superficie de la película, dejando un tiempo de equilibrio de 30 segundos antes de medir el ángulo de contacto de la gota con la superficie.

2.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos de los compósitos fueron tomados usando un espectrofotómetro Shimadzu IR Prestige-21 a temperatura ambiente en la región de 4000-600 cm^{-1} con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) y punta plana, analizando tanto las películas obtenidas por *solvent casting* como por extrusión.

2.4.2 Permeabilidad al vapor de agua

El coeficiente de permeabilidad al vapor (Q_{H_2O}) indica la cantidad de vapor de agua que atraviesa desde dentro del interior de una celda metálica hacia el exterior de una película polimérica en un tiempo determinado. Este valor se midió mediante el método gravimétrico de pérdida de peso similar al mencionado en la norma ASTM E96/E96M-16.⁹¹

En el procedimiento, se vertieron 6 ± 0.05 g de agua destilada en una celda cilíndrica de aluminio con un diámetro de 35 mm y un área de permeación de 0.00096 m^2 . Las cámaras se almacenaron a 20°C y 60% de humedad relativa, y finalmente, se registró la pérdida de

peso del agua hasta llegar a un valor constante. La velocidad de transmisión de vapor de agua WVTR ($g\ m^{-2}\ d^{-1}$) se determinó con la Ecuación 5, donde ΔW corresponde al cambio de peso en el recipiente, Δt el tiempo entre transcurrido entre las mediciones, y A el área de permeación.

$$WVTR[g\ m^{-2}\ d^{-1}] = \frac{1}{A_{pelicula}} \frac{\Delta W}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 5}$$

Con el WVTR se estimó el Q_{H_2O} (en $g\ mm\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}$) de la película (Ecuación 6). Donde l corresponde al espesor de la película, P_{sat} la presión de saturación, RH_{int} la humedad relativa dentro de la cámara y RH_{ext} la humedad relativa en el exterior.

$$Q_{H_2O}[g\ mm\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}] = \frac{WVTR * l}{P_{sat} \left(\frac{RH_{int}}{100} - \frac{RH_{ext}}{100} \right)} \quad \text{Ecuación 6}$$

2.4.3 Permeabilidad al oxígeno

El coeficiente de permeabilidad al oxígeno (Q_{O_2}) mide la cantidad de oxígeno atmosférico que atraviesa una película polimérica en su paso hacia el interior de una celda metálica en un tiempo determinado. Este se midió colocando las películas en una celda de aluminio (8 cm de diámetro) con válvulas, que controlan el flujo de gas. El contenido inicial de oxígeno en la celda se midió utilizando como sensor una placa de platino. Posteriormente, se inyectó nitrógeno para eliminar el oxígeno de la celda, y las válvulas se cerraron cuando el contenido de oxígeno alcanzó a cero. Luego, la celda se colocó en una cámara con humedad (60%) a temperatura fija (20°C), y el contenido de oxígeno se midió durante cinco días. Esta prueba se realizó según la norma ASTM D3985.⁹¹

2.4.4 Estereoscopia

Mediante la estereoscopia se observó la dispersión y distribución de los polímeros y los aditivos en las mezclas, como medida indirecta de la homogeneidad de los componentes PHBV/PLA/MC-Est. Para esto, se empleó un estereomicroscopio Nikon SMZ800 junto con una pantalla DS-L3 para la captura y medición de imágenes.

2.4.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de los materiales se analizaron en un calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo DSC 1-500/2722. Este se realizó con una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 10°C/min en un ambiente de N₂ con un flujo de gas de 50 mL/min. En este análisis se utilizaron muestras de aproximadamente 5 mg, la cual se cargó en una capsula de aluminio. Inicialmente, se realizó un calentamiento de 25°C a 250°C para eliminar la historia térmica; posteriormente, se llevó a cabo un enfriamiento de 250°C a -10°C, y finalmente, se volvió a calentar de 25°C a 250°C.

2.4.6 Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de las muestras de MC y mezclas poliméricas se estudiaron mediante un analizador térmico TGA- Mettler Toledo. Las muestras se pesaron entre 5-15 mg y se midieron en un intervalo de 30-500°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Todos los experimentos se llevaron a cabo en atmosfera de nitrógeno a 50 mL/min con el fin de evitar la degradación termo-oxidativa de las muestras.

2.5 Caso de estudio – Almacenamiento de chocolate

Con el fin de observar los efectos de las películas de PHBV en el almacenamiento de un producto agrícola comercial y contribuir al Macroproyecto con la UIS, se analizó un caso estudio preliminar, en el cual se empacó chocolate negro con contenido de cacao del 85% y 90%.

Se empacaron 50 barras de chocolate en bolsas de PHBV de 10 cm x 10 cm selladas y marcadas. Estas se almacenaron a condiciones ambiente de la ciudad de Bogotá (20°C y 49% humedad). Para obtener el perfil de sabor del producto, se seleccionó un panel de 15 personas que calificaron diferentes características organolépticas de las barras de chocolate cada 15 días o 30 días a lo largo de un periodo de 182 días.

El perfil se obtuvo siguiendo la norma NTC 3929:2021,⁹² donde se llevó a cabo una evaluación producto a producto. Los panelistas recibieron las muestras con una encuesta (Anexo A) donde se calificaba

los atributos sensoriales y las notas características. A continuación, se muestran los atributos calificados:

- Atributos visuales evaluados: color, homogeneidad, textura.
- Atributos olfativos evaluados: aroma
- Atributos acústicos evaluados: crujido
- Atributos de tacto evaluados: firmeza y adhesión
- Atributos del gusto: amargor, acidez, astringencia, sabor a cacao, dulce, nueces, frutas frescas, frutos secos, flores y especias y regusto
- Atributos de defecto: hongos, humedad, rancidez, tierra, químicos, humo y agrio.

Para evaluar la intensidad de los atributos, se utilizó la escala tipo **A**,⁹² donde se calificó la percepción según la Tabla 9.

Tabla 9. Escala tipo **A** de evaluación de intensidad de atributos.⁹²

Puntuación	Percepción
0	No presente
1	Apenas reconocible
2	Débil
3	Moderado
4	Fuerte
5	Muy fuerte

2.6 Extracción de aceites esenciales

2.6.1 Hidrodestilación de aceite esencial de limoncillo

Teniendo en cuenta la poca información técnica sobre aceite de limoncillo (LEO) comercialmente disponible, también se realizó un proceso de extracción de LEO a partir de plantas. Para esto, la extracción del aceite de limoncillo (LEO) se realizó por medio de hidrodestilación utilizando un montaje de arrastre con vapor a escala plata piloto con capacidad para 5 kg de material vegetal (Figura 7). Inicialmente se realizó el corte de la hoja y el tallo del limoncillo (*Cymbopogon citratus*) con el fin de aumentar el área de

contacto. Posteriormente, se realizó el calentamiento de la caldera, se abrió la válvula del flujo de condensación y se llenó el reactor con el material vegetal. En este caso debido al alto volumen ocupado por el material vegetal se realizaron dos extracciones con alrededor de 3 kg en cada una. Luego de llenar el recipiente, se cerró herméticamente y se abrió la válvula de entrada del vapor de agua. La extracción se detuvo cuando no se observó más aceite en el condensado, se separó el tubo en U del sistema, se hizo la separación del aceite y su cuantificación.



Figura 7. Extractor por arrastre de vapor a escala piloto del laboratorio de Productos Naturales Vegetales del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia

2.7 Determinación de carácter antimicrobiano

2.7.1 Prueba *in vitro* de efectos inhibidores

El efecto inhibitorio de las muestras de LEO sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* se evaluó mediante el método de difusión en fase de vapor.⁴³ En una primera etapa, con el fin de descontaminar el medio, las cajas de Petri y el agar fueron sometidas a un ciclo de autoclave de 20 min a 200°C. Posteriormente, se dispuso una hoja de celofán y la cepa de *Botrytis cinerea* LPNV8 en una caja Petri con PDA, la cual fue sellada y cultivada por un periodo de 7 días.

A continuación, se transfirió una muestra del hongo a las cajas de Petri con PDA utilizando un pitillo y se sembró en el centro. Simultáneamente, en el centro de la tapa de la caja Petri se colocó un trozo de papel filtro Whatman No.1 (radio 0.2 cm), el cual fue impregnado con 10µL de las muestras de LEO concentrado. La caja de Petri se selló con parafilm y se cultivó en posición invertida, con el hongo en PDA en la parte superior y el papel filtro con la muestra de LEO en la parte inferior, durante un período de 10 días a una temperatura de 22±1°C.

$$\text{Concentración: } \frac{\text{Volumen del aceite}}{\text{Volumen total del espacio}} = \frac{10 \mu\text{L}}{0.080 \text{ L}} = 125 \mu\text{L/L} \quad \text{Ecuación 1}$$


El aceite esencial evaporado proporcionó una concentración de 125µL de aceite esencial en un litro de aire, según se detalla en la Ecuación 1. El experimento fue llevado a cabo por triplicado para cada uno de los LEO. El crecimiento de colonias se observó en el 3er, 4to, 7mo y 10mo día de cultivo. La actividad antifúngica de los aceites esenciales se expresó mediante la inhibición relativa calculada mediante la Ecuación 2, donde *RI* es la inhibición relativa en porcentaje, *c* es el diámetro de la colonia en el control y *t* es el diámetro de la colonia tratada con aceites esenciales.

$$RI = \left[\frac{c-t}{c} \right] * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

2.7.2 Ensayos *in vivo*

Para determinar la capacidad preservante, inicialmente se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en fresas con el fin de detectar la concentración del aceite esencial que tuviese un efecto antimicrobiano sin afectar las propiedades organolépticas de la fresa. Se seleccionaron fresas de un mercado local de la ciudad de Bogotá, estas se empaclaron en envases comerciales de PET con capacidad de 473 mL, en cantidades de cuatro fresas por empaque. Posteriormente, se introdujo un trozo de papel de filtro Whatman No.1 (radio 0.5 cm) en un extremo del empaque y se impregnó con el LEO concentrado, se utilizaron concentraciones de 200, 100, 75, 50 y 25 µL/L. Los envases se cerraron y se monitorizó el crecimiento de colonias cada 24 h aproximadamente y su peso. Se analizó la gravedad de la enfermedad siguiendo la escala empírica de 6 puntos mostrados en la Tabla 10.³³

Tabla 10. Escala empírica de 6 puntos para análisis de gravedad de enfermedad.

Puntuación	Porcentaje de la superficie de la fruta infectada	Montaje
1	1% - 20%	
2	21% - 40%	
3	41% - 60%	
4	61% - 80%	
5	>80% y mostrando esporulación	

También se hace un análisis de aceptabilidad de la fruta, donde se califica en base al color, olor y dureza (esta prueba se hizo como un acercamiento por lo cual solo se hizo con un analizador, el cual califico la muestra según su criterio). Teniendo como puntaje una escala de 0 a 5 donde 0 significa para nada aceptable, 1 no aceptable, 2 poco aceptable, 3 moderadamente aceptable, 4 aceptable, y 5 totalmente aceptable. Este proceso se hizo con cada muestra y se promedió los resultados.

2.7.3 Caso estudio- Almacenamiento de fresas incluyendo en el empaque una lámina de PHBV/PLA/MC-Est

Con el fin de analizar el comportamiento del empaque con la adición de una lámina de PHBV/PLA/MC-Est, se hicieron pruebas introduciendo una película de PHBV/PLA/MC en los empaques comerciales, se cortó una película de 8 cm x 8 cm, esto con el fin de definir si existía un cambio en el efecto inhibitorio al aumentar la permeabilidad de la película, y se pegó a la parte superior del empaque. Posteriormente se dispusieron concentraciones de 100 μ L/L en un papel filtro y se introdujo en el empaque junto a 4 fresas como en el ensayo anterior, se pesaron y se monitorizó el estado de la fruta cada 24 h aproximadamente por 5 días, al quinto día se hizo el análisis de aceptabilidad.

3. Desarrollo de la matriz polimérica PHBV/PLA

Teniendo en cuenta las propiedades mecánicas, térmicas, de barrera y fisicoquímicas de los materiales poliméricos, así como la influencia de las proporciones de cada uno de estos en una matriz, en este capítulo se realizó el estudio de la mezcla PHBV/PLA. Se llevó a cabo un acercamiento inicial a las propiedades de la matriz mediante el uso de películas obtenidas por solvent casting en cuatro diferentes proporciones (100/0, 80/20, 60/40 y 50/50). Posterior al estudio de las propiedades mecánicas (módulo elástico, esfuerzo a la ruptura y deformación a la ruptura) de estas, y habiendo seleccionado la mejor proporción de polímeros para un material rígido y para un material flexible, se escaló el proceso mediante la extrusión de las matrices.

Tanto las películas obtenidas por solvent casting como por extrusión fueron caracterizadas en sus propiedades mecánicas, fisicoquímicas y de barrera, con el fin de comparar y definir el posible uso de la película.

3.1 Introducción

El *solvent casting* y la extrusión son los métodos que más comúnmente se usan para fabricar películas de PHBV/PLA en diferentes proporciones.²² El *solvent casting* implica el uso de un disolvente como la N,N-dimetilformamida (DMF), cloroformo, o ácido acético para disolver el polímero y, a continuación, moldearlo en una película mediante una técnica de fundición.^{93,94} Por otra parte, la extrusión implica fundir el polímero, que por acción de un tornillo sin-fin pasa a través de un dado y calandra para formar una película.

En términos de propiedades, se ha observado que las películas obtenidas por *solvent casting* tienen una superficie más rugosa, dispersión, distribución y estructuras cristalinas diferentes en comparación con las películas procesadas por extrusión.⁹⁵ Sin embargo, el *solvent casting* requiere de menores cantidades de polímero ya que es considerado una técnica escala laboratorio (por lo cual es el más reportado en la literatura científica), en comparación con la extrusión, la cual es una técnica disponible a escala piloto y requiere de mayores cantidades de materia prima. Teniendo en cuenta lo anterior, en este capítulo se estudiaron las dos técnicas, el *solvent casting* como técnica exploratoria para obtener las propiedades mecánicas (módulo elástico, esfuerzo a la ruptura y deformación a la ruptura) de cuatro proporciones de PHBV/PLA y la extrusión, como método de escalado para obtener las películas de PHBV/PLA con las cuales se pueda estudiar la propiedades mecánicas, físicas y barrera de los polímeros, con mejor prospecto para empaques rígidos o flexibles.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Películas por *solvent casting* de PHBV/PLA

El método de *solvent casting* dio como resultado películas de PHBV/PLA opacas y rugosas, de tonalidad lechosa. En este caso en particular, se buscaba obtener matrices como posible remplazo de materiales rígidos. Por lo cual, se realizaron mezclas que llevaron a espesores de 1.15 mm a 1.5 mm, ya que este espesor es el utilizado en canastas de frutas, como la de la uchuva. De manera que en las películas PHBV/PLA por *solvent casting* y

probablemente debido, entre otros, a su alto espesor y cantidad de material polimérico, se puede observar una superficie rugosa (Figura 8), con aglomeraciones que afectan la superficie de la película, generando uniformidad. Este efecto se puede notar en mayor cantidad cuando se aumenta la cantidad de PHBV.

En el procesamiento con *solvent casting*, la mezcla de PHBV/PLA solo puede llevarse hasta la temperatura de ebullición del solvente usado, y para los solventes del experimento (Figura 8) sus puntos de ebullición están por debajo de la temperatura de fusión de los polímeros en la mezcla, con lo cual no es posible lograr fluidez de los dos polímeros, ni tampoco romper todas las atracciones intracadena de cada polímero.

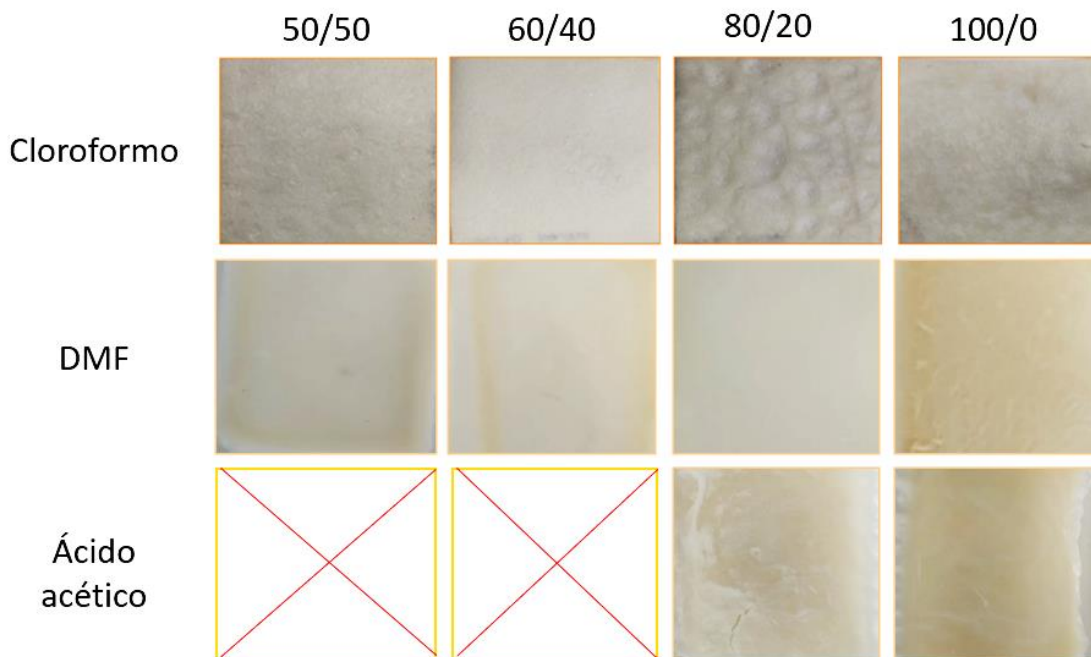


Figura 8. Películas obtenidas por *solvent casting* utilizando como solvente cloroformo, DMF y ácido acético (Donde las “X” significa que no se logró obtener una película).

Es importante destacar que, para lograr un espesor superior a 1.5 mm en películas de PHBV/PLA fabricadas por *solvent casting*, los solventes más efectivos son el cloroformo y el DMF. A pesar de que el ácido acético se ha mencionado en diferentes artículos como un solvente que produce películas con mejores propiedades que las obtenidas con cloroformo,⁹⁶ (debido a las altas temperatura de disolución que maneja) y que se prefiera por ser un solvente más amigable con el medio ambiente,⁹⁷ en este estudio se observó que este solvente tenía una tendencia a retenerse en las películas, generando un

comportamiento más plástico, es decir, tenían una mayor deformación al esfuerzo. Además, durante el proceso se producía adherencia entre la película y el molde, dificultando su desmolde y generando la rotura de la película. Sin mencionar que el material obtenido despedía un olor fuerte a ácido acético, lo que llevó a su descarte como solvente para el muestreo por *solvent casting*. Por otra parte, las películas obtenidas por DMF y cloroformo tenían un aspecto similar, aunque las películas de DMF al tener un tiempo de secado más corto, en algunos casos la capa superior se solidificaba antes de que se volatilizará todo el solvente provocando la formación de burbujas, por lo cual se seleccionó como solvente el cloroformo ya que requería condiciones de temperatura de disolución y de secado menores, los cuales permitían un secado más uniforme del material.

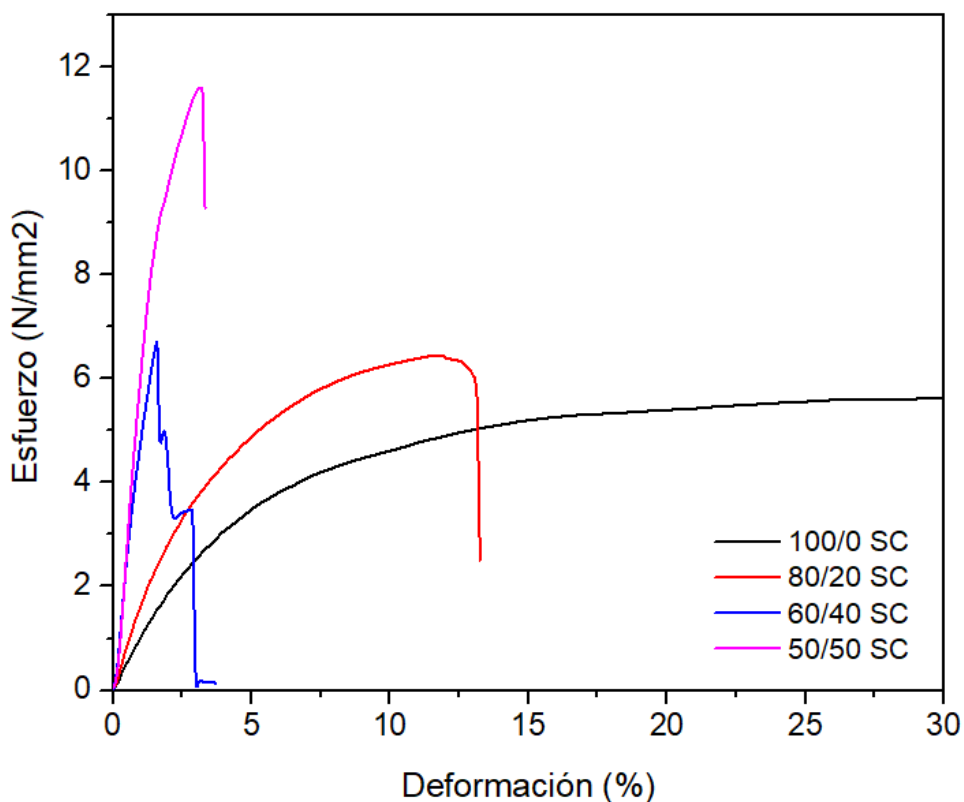


Figura 9. Curvas de esfuerzo-deformación de películas de PHBV/PLA por *solvent casting* (SC) en proporciones de PHBV/PLA de 100/0, 80/20, 60/40 y 50/50.

Las fracturas de un material se pueden clasificar en dos grupos: frágil y dúctil. Esta clasificación se basa en la capacidad del material para experimentar la deformación plástica. La fractura frágil sucede por la propagación rápida de la fisura después de poca

o ninguna deformación plástica; esta fractura es característica de los materiales rígidos. Este comportamiento se pudo notar en las probetas de PHBV/PLA de proporciones 50/50, 60/40 y 80/20 (Figura 9). Para el caso de las probetas de PHBV/PLA 100/0 se tuvo primero un comportamiento elástico y posteriormente una ruptura frágil este comportamiento se puede observar en empaques con un carácter más flexibles. La fractura dúctil se obtiene en materiales totalmente flexibles donde la fractura se prolonga con la deformación plástica, este comportamiento no se observó en ninguna de las películas obtenidas por *solvent casting*. También se tiene que el proceso de fractura está compuesto por dos etapas; una de formación y otra de propagación, la cual se da en respuesta a una tensión aplicada. En este caso, cuando las probetas son fabricadas desde películas obtenidas por *solvent casting*, estas presentaron una ruptura inicial, seguida de una propagación rápida de esta por lo cual no se alcanzaba a formar un encuellamiento.

Tabla 11. Propiedades mecánicas de películas de PHBV/PLA por *solvent casting* variado las proporciones de PHBV y PLA.

Proporción PHBV/PLA	Esfuerzo de ruptura	Deformación a la ruptura	Módulo elástico
	MPa	%	GPa
50/50	11.44 ± 2.93	3.29 ± 1.13	0.71 ± 0.06
60/40	9.94 ± 2.42	3.29 ± 1.12	0.61 ± 0.04
80/20	5.89 ± 0.13	13.09 ± 1.98	0.13 ± 0.02
100/0	5.66 ± 0.83	29.72 ± 1.41	0.087 ± 0.01

En las curvas de esfuerzo-deformación (Figura 9) de las películas por *solvent casting* se puede notar que las películas con mayor comportamiento rígido fueron las de concentraciones de PHBV/PLA 50/50, debido a que se llega a una baja deformación alrededor del 3% con un esfuerzo de 11.42 N/mm². El cuál es el mayor de las pruebas realizadas dándonos a entender que las proporciones PHBV/PLA más ideales para empaques rígidos, como los usados en canastillas de uchuva, son las de proporciones de 50/50. Por el contrario la proporción PHBV/PLA 100/0 tenía un comportamiento más plástico, como el deseado para un empaque de chocolate, es decir una alta deformación a bajo esfuerzo, con una mayor deformación a la ruptura en 29.72%, muy superior a las demás proporciones. Lo cual indicaría que el PLA está aumentando la rigidez del material como se puede observar en el módulo elástico, donde la mezcla de 50/50 PHBV/PLA tiene un aumento del 93.8% en el módulo elástico comparado con la película de PHBV como se

observa en la Tabla 11. Este fenómeno también se observó en estudios de adición de PHBV al PLA donde se encontró que el esfuerzo de ruptura y el módulo de elástico decrecían con el incremento de PHBV, y los máximos parámetros obtenidos se encontraron con la adición de 10 % PHBV.^{60,62}

Absorción de agua e hidrofobicidad

La afinidad de un empaque biodegradable por el agua determina en gran medida su tiempo de vida antes y durante su uso. Por lo tanto, se analizó si la relación PHBV/PLA en la película influyó en la capacidad de absorción de agua y su hidrofobicidad, esta característica es de crucial importancia cuando se utiliza un material biodegradable para el almacenamiento y transporte de productos frescos. Se realizaron ensayos de absorción al agua siguiendo la norma ASTM D570,⁹¹ a muestras de PHBV/PLA, las cuales fueron producidas utilizando cloroformo como solvente. En estas pruebas se puede observar como la inclusión de PLA disminuyó la absorción al agua, razón por lo cual las proporciones 50/50 y 60/40 mostraron valores de absorción al agua más bajos (1.07% y 0.95% respectivamente) como se observa en la Figura 10. Además, se pudo observar que las películas de 100/0 y 80/20 seguían absorbiendo agua sin alcanzar un punto de equilibrio por lo cual se puede suponer que tienen una absorción al agua mayor al reportado para las 350 horas. Cabe resaltar que no fue posible encontrar reportes en la literatura científica sobre la absorción de agua del PHBV, PLA o sus mezclas.

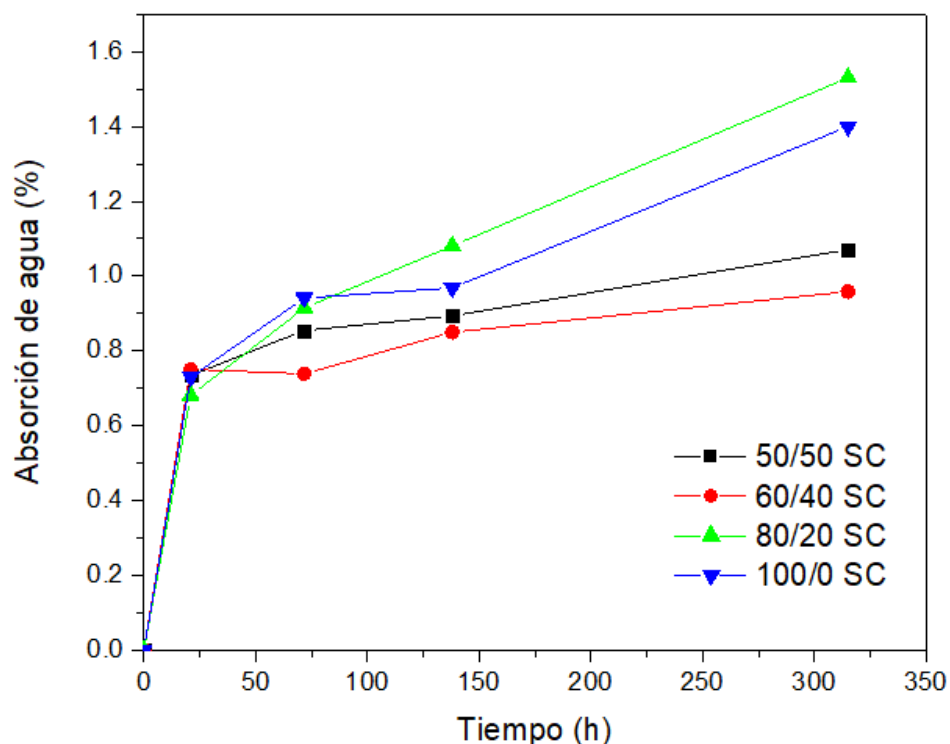
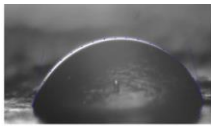





Figura 10. Curvas de absorción al agua de películas PHBV/PLA realizadas por *solvent casting*.

Por otra parte, la hidrofobicidad de un material se puede medir a partir del ángulo de contacto que se forma al estar en contacto un líquido con un sólido, debido a la tensión superficial entre estos y el medio circundante. Para el caso de películas por *solvent casting* de PLA y PHBV se han reportado ángulos de contacto de 66.9° y 72.7° , respectivamente,^{98,99} y valores de 65.5° para mezclas 50/50 PHBV/PLA.⁹⁸ En el presente estudio se encontró que las películas tenían un mayor ángulo de contacto al reportado (Tabla 12). Además, se puede destacar que la adición de PLA disminuye el ángulo de contacto de la película. En este caso, al ser películas producidas por *solvent casting*, la superficie no presenta uniformidad y esto influyó en la variabilidad de la medida, como se puede notar en la desviación de los valores obtenidos. Adicionalmente, las películas por *solvent casting*, al requerir de 72 horas para que el solvente se volatilice en su gran mayoría, genera que la cristalización sea lenta, formándose así áreas de PHBV y áreas amorfas de PLA. Esto afecta la homogeneidad de la película, ya que, aunque los dos polímeros estén distribuidos por toda la mezcla, estos no se dispersan entre sí, si no que forman aglomeraciones de sí mismos. Lo cual se ha podido observar en estudios con microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se encontró que en proporciones de

PHBV mayores al 30% en películas de PLA/PHBV mostraba una morfología de dos fases.⁶⁸ Dando como resultado que se encuentren sitios hidrofóbicos e hidrofílicos dentro de una misma película. Lo cual influye en la variabilidad de la hidrofobicidad que es de alrededor de 4° en proporciones de PLA mayores a 20%.

Tabla 12. Angulo de contacto de películas de PHBV/PLA realizadas por *solvent casting*.

Proporción	50/50 SC	60/40 SC	80/20 SC	100/0 SC
Angulo de contacto				
	75.213 ± 4.266	79.565 ± 4.216	76.211 ± 5.442	97.599 ± 1.907

3.2.3 Películas de PHBV/PLA por Extrusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización realizada a las películas por *solvent casting*, se decidió escalar la extrusión de las películas con proporciones de PHBV/PLA de 50/50 y 100/0, ya que cada una de estas proporciones mostró un comportamiento opuesto, por lo cual se puede utilizar en dos aplicaciones: uno en empaques rígidos y el otro en empaques flexibles. Este hecho es de gran importancia ya que en la industria agrícola se requiere de ambos tipos de empaques. Los empaques rígidos son necesarios en el empaquetamiento de productos frágiles como las uchuvas, arándanos, fresas, en la mayoría de las bayas las cuales son sensibles a daños mecánicos. Por otra parte, frutos como la gulupa, tomate de árbol, maracuyá, o productos procesados como el chocolate y frutos secos utilizan empaques flexibles los cuales requieren de altas propiedades de barrera.

Las películas obtenidas por extrusión mostraron, como era de esperarse, mejor dispersión y distribución del PLA sobre el PHBV, obteniendo así, películas más homogéneas que las obtenidas por *solvent casting*, gracias a dos factores importantes: la temperatura a la cual se realizó el procesamiento del material y el tipo de mezclador de los dos polímeros. Esto se debe a que, en la extrusión los polímeros y aditivos se mezclaron en un rango de 170-190°C, donde los polímeros se funden y la parte amorfa, así como la cristalina de cada

polímero, tienen mayor movilidad. Además, el movimiento del tornillo permitió que las cadenas de los dos materiales, PHBV y PLA, fluyeran una sobre la otra, lo que permitió aumentar las interacciones de los dos materiales, posibilitando una mayor dispersión y distribución de los materiales.¹⁰⁰ Adicionalmente, en la extrusión, el material se enfrió en los rodillos de la calandra a una velocidad de 40 rpm y los diferentes polímeros no tuvieron tiempo de aglomerarse.⁶⁶ Por lo tanto, al mejorar la distribución y dispersión del PLA sobre el PHBV se obtienen películas con mayor homogeneidad que las obtenidas por *solvent casting* (SC), como se puede observar en la microscopia de la Figura 11. Donde se puede observar claramente como, en el *solvent casting*, aunque se tiene la distribución de los dos polímeros estos no se mezclan, si no que forman capsulas de sí mismos, por el contrario, en la extrusión, no se observa una aglomeración significativa de alguno de los dos polímeros.

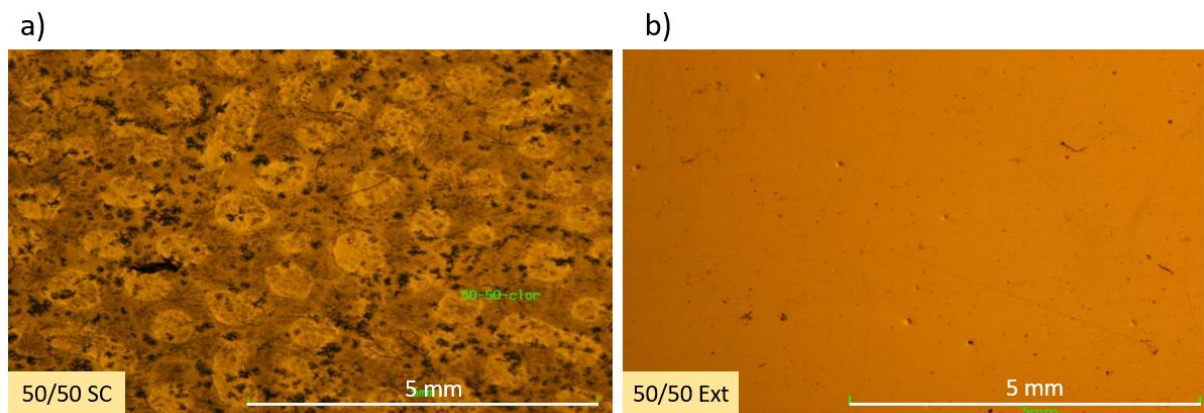


Figura 11. Estereoscopia de las películas PHBV/PLA 50/50; a) *solvent casting* (SC) b) extrusión (Ext).

Para realizar los ensayos mecánicos de películas obtenidas por extrusión, se realizaron dos cortes: uno transversal y uno longitudinal a la forma en que se extruye el material. Esto con el fin de analizar el comportamiento de la película frente al esfuerzo en los dos diferentes cortes del material. Al hacer el ensayo, se observó que las probetas cortadas de manera longitudinal tenían un comportamiento altamente elástico en el que se producía una ruptura dúctil, formándose un encuellamiento (Figura 12, cuadro en rojo) que se propagaba a través de la probeta.

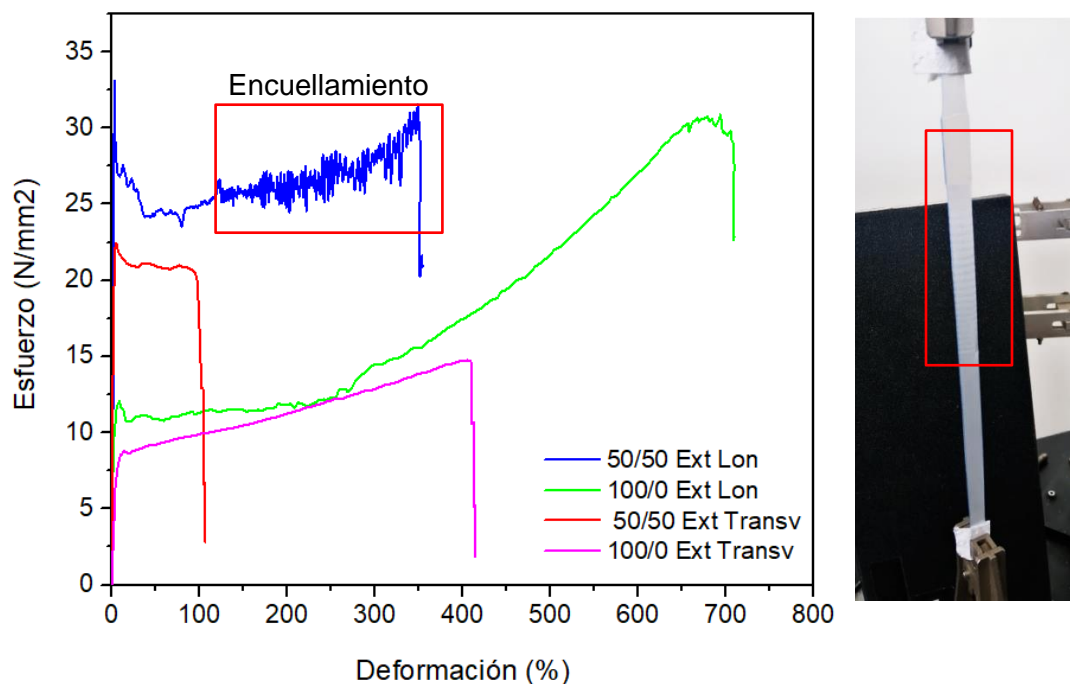


Figura 12. Curvas de esfuerzo-deformación de PHA/PLA por extrusión de muestras longitudinales y transversales. Y encuellamiento presentado por la probeta 50/50 durante el experimento

Por su parte, en las curvas de esfuerzo-deformación de las probetas longitudinales hubo una alta deformación a bajos esfuerzos, sobre todo en las proporciones de PHBV/PLA 100/0. Por lo cual se pudo corroborar el comportamiento que se tuvo por *solvent casting*, con lo cual se concluye que la adición de PLA aumenta la rigidez del material. Por su parte, las probetas transversales, en comparación con las longitudinales, mostraron menos plasticidad; esto se debe a que al momento de extruir se crea una mejor interacción entre las moléculas que se tienen longitudinalmente que la que se tiene en orientación transversal como se muestra en la Figura 13,¹⁰¹ por lo cual, las probetas transversales se fracturan con menor esfuerzo.

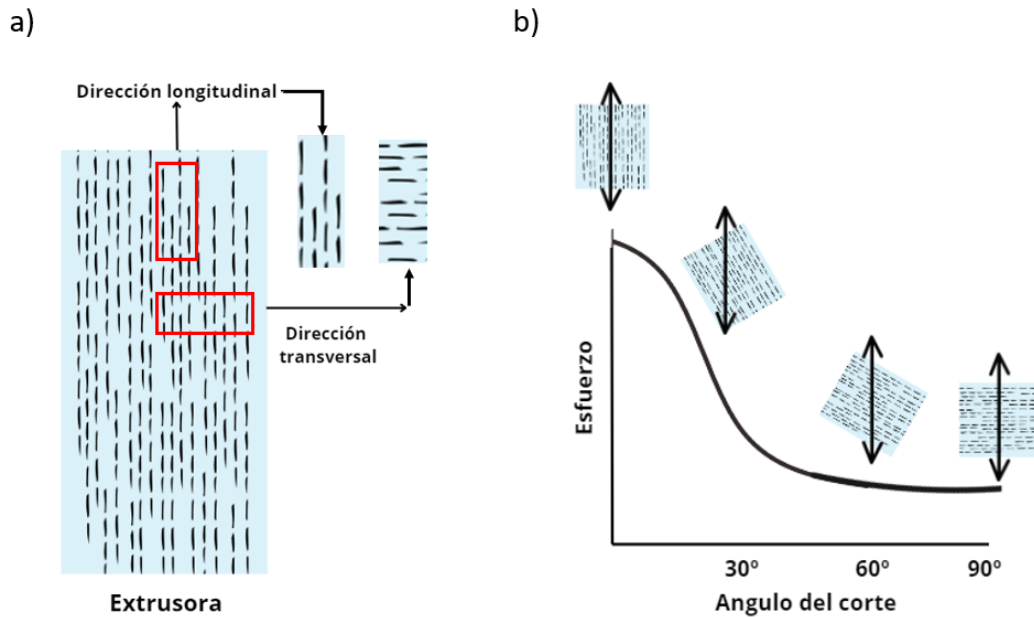


Figura 13. a) Representación esquemática de la probeta utilizada en ensayos mecánicos
 b) Resistencia a la tracción en diferentes orientaciones de la fibra con respecto a la dirección de carga.¹⁰¹

Por otra parte, al comparar los resultados para las películas PHBV/PLA 50/50 con los reportados para el polipropileno (PP) y el polietileno tereftalato (PET), materiales a reemplazar en empaques rígidos, se observa que la película biodegradable tiene valores de módulo elástico y esfuerzo de ruptura por debajo de reportados para estos dos polímeros, en especial al del PET (Tabla 13). Sin embargo, los valores más cercanos en términos de esfuerzo de ruptura y módulo elástico fueron los dados por la proporción PHBV/PLA 50/50. De manera que, las películas realizadas por extrusión mostraron valores de deformación a la ruptura mucho más altos que los del PP y el PET, haciendo que, las películas obtenidas tengan características más flexibles, y propiedades más cercanas a las del PE-HD. En conclusión, las películas obtenidas por extrusión mostraron un comportamiento flexible, y se pueden utilizar para reemplazar empaques de PE-HD, como el usado para empaques de gulupa, chocolates, entre otros.

Tabla 13. Propiedades mecánicas del corte longitudinal de películas PHBV/PLA obtenidas por extrusión comparadas a las reportadas para el PP, PET, PE-HD y PA.

Composición	PHBV/PLA (50/50)	PHBV (100%)	PP	PET	PE-HD
Módulo elástico (GPa)	1.24 ± 0.02	0.09 ± 0.03	1.95	9.35	0.5-1.1
Esfuerzo de ruptura (MPa)	31.59 ± 2.19	28.72 ± 3.03	31-4	62	30
Deformación a la ruptura (%)	340.61 ± 1.71	701.45 ± 5.10	50-145	230	200-600

Absorción de agua y barrera a gases en películas por extrusión

Al realizar esta prueba con muestras extruidas, se observó como la absorción aumentó en las primeras horas y disminuyó posteriormente, llegando a valores menores al 0.3% de agua absorbida. Mostrando diferencias no significativas entre la adición de PLA después de las 72 h (Figura 14). Al comparar la absorción de agua entre las muestras producidas por *solvent casting* y extrusión, se encontró que la cantidad de agua absorbida por las películas PHBV/PLA obtenidas por *solvent casting* aumentaba con la proporción de PHBV de la mezcla, y tanto la proporción de 100/0 como la de 50/50 aumentan con el tiempo sobrepasando el 1% de agua absorbida, contrario al comportamiento de las películas obtenidas por extrusión. Este hecho se puede atribuir a la adhesión de agua por la irregularidad de la superficie.

La baja absorción de agua en las películas extruidas permite el uso de este material, en aplicaciones donde el material está en contacto con productos con actividades de agua altas, como lo son las frutas.

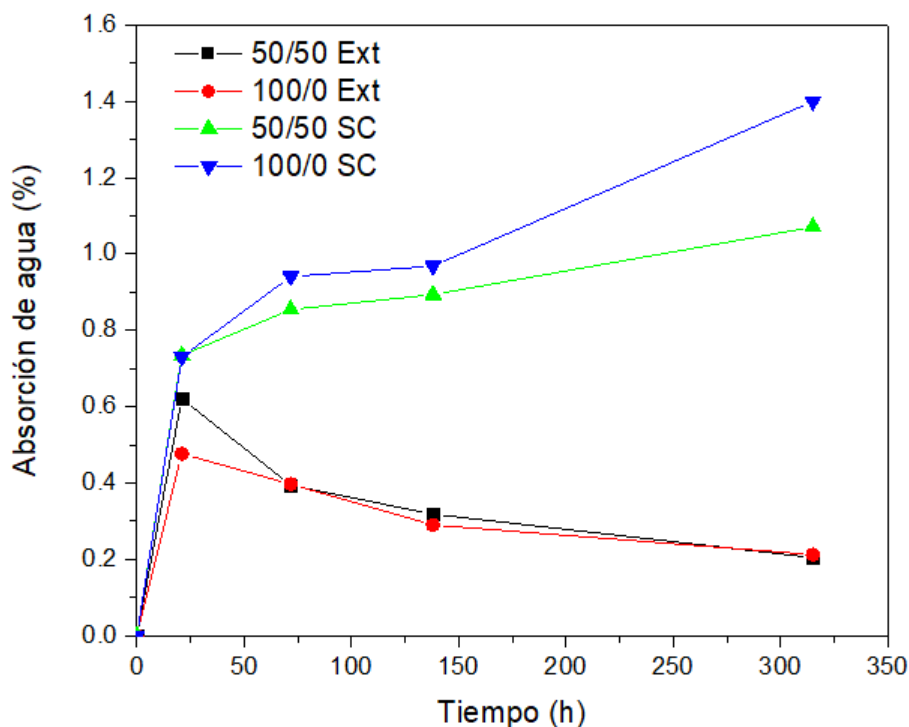


Figura 14. Curvas de absorción al agua de películas de PHBV/PLA por *solvent casting* y extrusión.

La Tabla 14 muestra que las películas de PHBV/PLA obtenidas por extrusión tienen un ángulo de contacto que aumenta con la proporción de PHBV. Al comparar los valores obtenidos con los referenciados (66.9° y 72.7° para PLA y PHBV, respectivamente),^{98,99} se nota que los valores obtenidos por extrusión, son mayores a los reportados no solo para el PHBV sino que también para el PP (99.5°).¹⁰² En el caso de la película 100/0 PHBV/PLA, se observa que los valores son considerablemente mayores, lo cual indica que nuestro material es altamente hidrofóbico.

Por otra parte, los ángulos obtenidos por *solvent casting* son menores en comparación con los de extrusión. Esto se debe a que la irregularidad de la superficie de las películas formadas por *solvent casting* interfiere en la posición de la gota, como se mencionó anteriormente. Donde cada punto de aglomeración o fase puede tener diferentes comportamientos frente al agua debido a la estructura química del polímero conformante de la aglomeración o fase. Sin embargo, siguen siendo más altos que los reportados en la literatura.

Tabla 14. Angulo de contacto de películas PHBV/PLA por extrusión.

Proporción	50/50 Ext	100/0 Ext
Angulo de contacto		
	69.144 ± 2.730	105.182 ± 1.784

Una de las propiedades barrera más importantes para el empaquetamiento de productos agrícolas es el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua (Q_{H_2O}) y la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR). Donde el Q_{H_2O} mide la resistencia al transporte de humedad a través del material de envasado. Para el empaque de productos agrícolas, como frutas y verduras frescas, se requieren valores de altos a moderados como los que se tienen en las películas de poliamida (PA), donde se genera un equilibrio entre la condensación de agua en la película (que puede causar daños por microorganismos) y la velocidad de deshidratación del producto (que causa pérdida de masa). Por lo tanto, valores de permeabilidad muy bajos o altos pueden provocar cambios desfavorables en las propiedades organolépticas del producto envasado.

Tabla 15. Permeabilidad al vapor de agua de películas de PHBV/PLA por *solvent casting* (SC) y por extrusión (Ext)).

Muestras	Espesor	WVTR	Q_{H_2O}
	mm	$g\ m^{-2}\ d^{-1}$	$g\ mm\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}$
PHBV SC	0.077 ± 0.007	127.63 ± 3.20	913.57 ± 86.70
PHBV/PLA 50/50 SC	0.032 ± 0.002	77.16 ± 4.51	228.53 ± 16.28
PHBV Ext	0.034 ± 0.001	46.66 ± 11.67	146.86 ± 45.14
PHBV/PLA 50/50 Ext	0.096 ± 0.001	10.79 ± 7.86	123.74 ± 99.43
PLA Ext	0.035 ± 0.003	42.3 ± 9.60	163 ± 45.86
PP ⁸⁸	0.025	8-14	20-36
PET ⁸⁸	0.025	5-10	13-26
PE-HD ⁸⁸	0.025	14-20	36-52
PA ⁸⁸	0.025	40-150	104-392

La evaluación de la permeabilidad al vapor de agua (Q_{H_2O} y WVTR) reveló que la mezcla de PHBV/PLA 50/50 exhibió valores inferiores en comparación con los materiales puros, como se detalla en la Tabla 15. No obstante, es crucial tener en cuenta que, al calcular el WVTR, no se considera el espesor de la película. Por lo tanto, los valores presentan una diferencia más significativa, destacándose que la película de PHBV/PLA 50/50 registra un valor de $10.79 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, lo cual es un 76% más bajo en comparación con los materiales puros. Al tener en consideración el espesor, que en el caso del PHBV/PLA es 2.82 veces mayor que la de los polímeros puros, se calcula el Q_{H_2O} . Este cálculo arroja una reducción del 15% y 24% para la película de PHBV/PLA en comparación con el PHBV y PLA. Esta disminución de la permeabilidad puede atribuirse a la dispersión de los dos polímeros en el material, especialmente del PHBV.

Al comparar los valores de Q_{H_2O} obtenidos para las muestras extruidas con los datos reportados para materiales como PE-HD, PP y PA, se evidencia que la permeabilidad al agua en las películas biodegradables es notablemente superior a la del PE-HD y PP. Este hallazgo es positivo, ya que uno de los principales inconvenientes de estos polímeros en empaques de alimentos es su baja permeabilidad, lo que ocasiona la condensación de agua durante el almacenamiento de algunos productos como las verduras y las frutas, generando problemas fitosanitarios. Al comparar las muestras con la PA, estas se sitúan en el rango de los valores reportados para la PA. En el caso de los productos agrícolas, como las frutas, se utiliza el valor más bajo reportado para la PA, que es $104 \text{ g mm m}^{-2} \text{ atm}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La mezcla PHBV/PLA exhibe valores cercanos a esta referencia, posicionándose como una alternativa adecuada en términos de permeabilidad al agua para empaques de productos agrícolas, como las frutas. Por otra parte, los valores obtenidos para el PHBV y el PLA son más altos, de manera que, si se pretende empaquetar frutas sensibles a la pérdida de peso, como la gulupa, se requiere de la disminución de esta propiedad.

Por otra parte, para las muestras evaluadas, se observó (Tabla 16) que las películas por *solvent casting* presentan valores de Q_{H_2O} superiores a los obtenidos en las muestras por extrusión. Este fenómeno se produjo debido a la falta de homogeneidad en las películas fabricadas por *solvent casting*, que presentaban fisuras o perforaciones que facilitan la permeación del vapor de agua.

Para el caso de la permeabilidad al oxígeno, solo se analizó la película PHBV/PLA 100/0 debido a que esta tenía mayor prospecto para empaques flexibles como se mencionó

anteriormente. Y por lo tanto podría usarse en los experimentos de almacenamiento de chocolate, donde la presencia de oxígeno puede afectar las propiedades organolépticas del mismo. También es importante recalcar que, esta propiedad depende en gran medida del espesor de la película, por lo cual, en empaques rígidos como los del PP y PET, donde se tienen espesores mayores la permeabilidad tiende a ser muy baja. Por el contrario, en los empaques flexibles donde los espesores son bajos, menores a 0.1 mm se requiere de materiales con una menor permeabilidad al oxígeno como la que ostenta la PA. Además, debido a la complejidad de la prueba, solo se analizó la película obtenida por extrusión, ya que las películas producidas por *solvent casting* presentaban fisuras y no generaban valores reproducibles.

Tabla 16. Permeabilidad al Oxígeno de películas de PHBV.

Muestra	Q _{O₂} (cm ³ mm/m ² atm d)
PHBV	56.62 ± 5.63
PP ⁸⁷	80-95
PLA ³³	83
PE-LD ⁸⁷	190-200
PA ⁸⁷	1-5

Los valores obtenidos para la película de PHBV fueron menores a los referenciados para el PP, PE-LD y el PLA, sin embargo, no alcanza valores como la poliamida, con lo cual se puede considerar esta película como posible remplazo del PE-LD y PP en empaque de productos que sean afectados por olores o que tengan reacciones con el oxígeno que deterioren el producto, tales como el chocolate, pero no para empacar gulupa, donde alta presencia de oxígeno genera sobremaduración y alta deshidratación de la fruta.

Análisis estructural por FTIR

Las películas de PHBV/PLA obtenidas fueron analizadas por medio de un análisis FTIR con el fin de identificar la distribución de los componentes en la mezcla (Figura 15). Ya que la técnica es superficial, si un polímero de la mezcla se encuentra en mayor proporción en la superficie del material, puede enmascarar al otro componente. La muestra de PHBV mostró señales características sobre 2924 cm⁻¹ y 2852 cm⁻¹ correspondientes a la vibración de estiramiento simétrico y asimétrica de CH₃ alifático, bandas en 1720 cm⁻¹ y 1647 cm⁻¹ correspondientes al estiramiento de C=O del grupo éster,¹⁰³ y bandas a 1465 cm⁻¹ de la

flexión de C-H y un pico de absorción importante en 1265 cm^{-1} asociada al enlace éster saturado de los grupos C-O. Por otra parte, para el caso del PLA sus señales más representativas se encuentran en 1751 cm^{-1} (no marcada en el espectro), y 1090 cm^{-1} , las cuales se relacionan a la absorción característica del grupo éster para -COO y CO, respectivamente.

Al analizar los espectros de las mezclas, a pesar de estar en la misma proporción los dos polímeros, se evidencia una mayor inclinación hacia el espectro del PHBV en la mezcla realizada por extrusión, donde es clara la presencia de señales características del CH_3 alifático (2924 cm^{-1} y 2852 cm^{-1}) y del grupo éster (11647 cm^{-1} y 1265 cm^{-1}), y ausencia de la señal sobre 1090 cm^{-1} propia del PLA. Esto podría sugerir una mayor presencia superficial del PHBV, lo que enmascara la presencia del PLA. Similar comportamiento presenta la mezcla PHBV/PLA por *solvent casting*. Una mezcla de PHBV/PLA 50:50 con óptima dispersión y distribución de los polímeros tiene que mostrar un espectro resultante con la sumatoria de todas las señales de los componentes individuales.

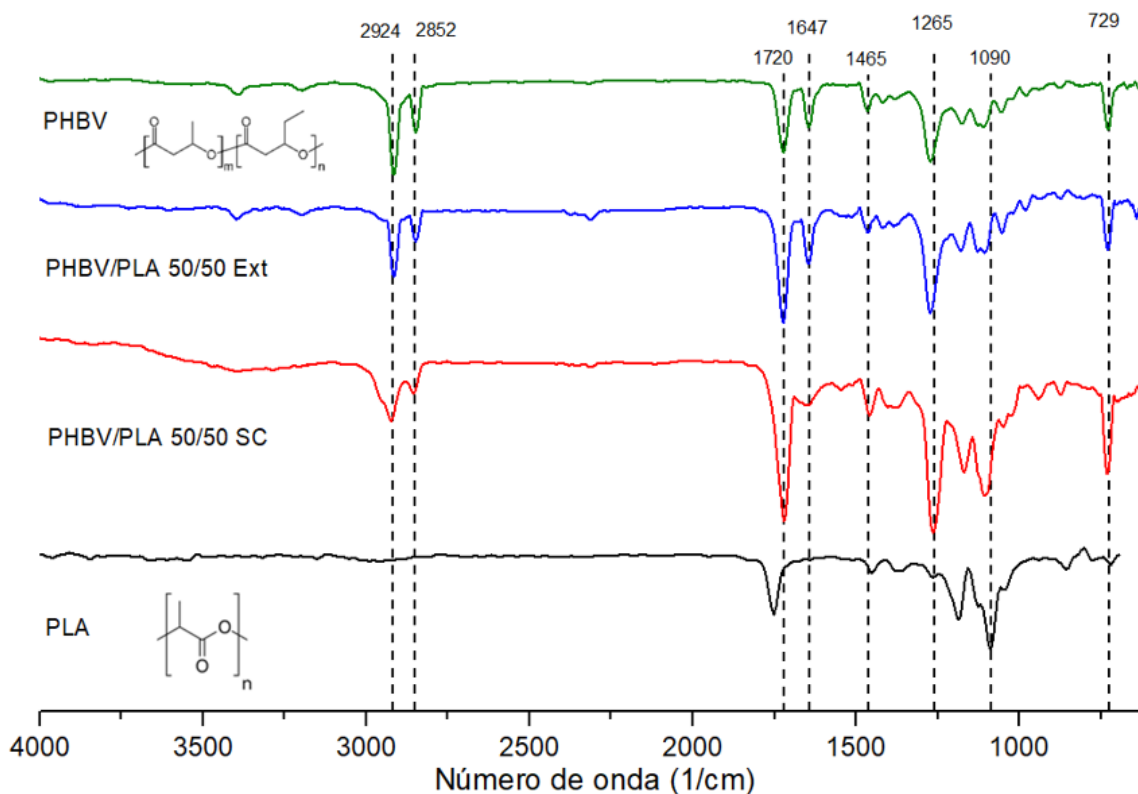


Figura 15. Análisis FTIR de películas PHBV, PLA y PHBV/PLA realizadas por extrusión (Ext) y *solvent casting* (SC).

Propiedades térmicas

Para el PHBV, el cual, al ser un copolímero, puede ostentar diferentes temperaturas de descomposición como se puede observar en la termogravimetría (TG) y la derivada de la termogravimetría (DTG) (Figura 16), se observa una primera pérdida de peso que se atribuye a la descomposición de las cadenas de PHB, el cual en literatura reporta una temperatura de descomposición alrededor de los 290°C.¹⁰⁴ La segunda caída se atribuye a la descomposición de las cadenas hidroxivalerato (HV) está pérdida de peso se encuentra centrada en 390°C. Por su parte, el PLA muestra una tasa máxima de descomposición localizada en 366°C, la cual es similar a la reportada en literatura.¹⁰⁵

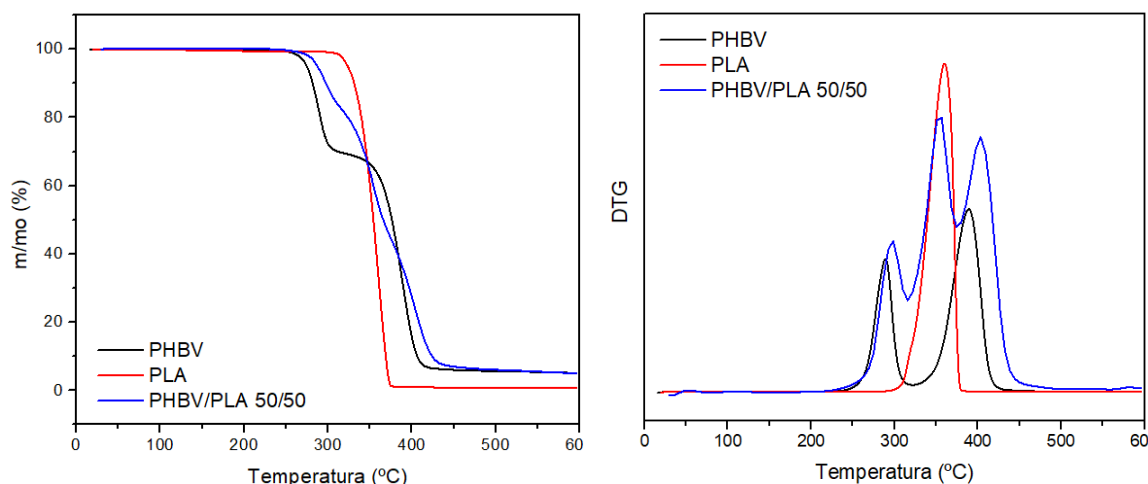


Figura 16. Curvas TG y DTG de PHBV, PLA y mezcla PHBV/PLA 50/50.

Ahora las curvas termogravimétricas de la película de PHBV/PLA 50/50, al ser comparadas con las curvas de los polímeros puros, mostraron en el DTG la unión de las diferentes pérdidas de peso. Observando dos pérdidas del PHBV y una debido al PLA. La segunda caída de la mezcla PHBV/PLA, se designa a la descomposición del PLA, la cual se encuentra a 359°C y tiene mayor amplitud debido a la alta proporción del PLA en la muestra. Las caídas correspondientes a la presencia de PHBV muestran un aumento en la temperatura de descomposición. Este aumento se puede atribuir a la presencia del PLA el cual ha demostrado que aumenta la estabilidad térmica del PHBV.⁶⁸ Este efecto causa una mejora en la estabilidad térmica del material y demuestra que la adición de PLA mejora las propiedades de procesamiento del PHBV, ya que al aumentar la temperatura de descomposición, se disminuirá la descomposición del material al extruir

3.2.4 Caso de estudio – Almacenamiento de chocolate

Tradicionalmente las barras de chocolate se envuelven en películas de aluminio o en empaques de PE con láminas de aluminio en su interior. Esta decisión se fundamenta en la baja permeabilidad a los gases del aluminio y su capacidad para preservar el perfil de sabor del chocolate, que es susceptible a la contaminación por olores. En este contexto, se empleó el método de perfil de sabor, el cual se basa en la evaluación de las características organolépticas de un producto, abordando aspectos como sabor, olor, textura, entre otros, que varía según el tipo de producto. El objetivo es determinar si el uso de películas de PHBV influye en estas características al empacar chocolates, ofreciendo así una alternativa que preserve la calidad sensorial del producto.

En la Figura 17, se presenta el empaque utilizado durante el almacenamiento de las muestras destinadas al ensayo. Estas muestras se conservan en condiciones ambientales de la ciudad de Bogotá, y se monitorearon mediante paneles sensoriales, en los cuales se evaluaron tres perfiles. En primer lugar, se realizó el perfil característico antes de consumir el producto, centrándose en las características visuales y olfativas. Posteriormente, al consumir el producto se evaluó el perfil de sabor, con el objetivo de analizar las variaciones en el sabor y determinar si estas estaban relacionadas con el empaque utilizado. Finalmente, se evaluaron posibles sabores defectuosos en el chocolate. Este análisis se realizó con el propósito de identificar reacciones no esperadas en el chocolate, como oxidaciones lipídicas que pueden dar lugar a enranciamiento y formación de *off-flavors* o contaminación por olores externos al empaque.



Figura 17. Barra de chocolate al 90% empacada en películas de PHBV.

A continuación, se muestra el perfil característico del chocolate al 85% y 90% contrastando las mediciones del primer día con las del día 182 (finalización del muestreo). En este se encontró como las barras de chocolate mantuvieron alta firmeza, crujido, aroma, textura y homogeneidad durante todo el tiempo de análisis. En la Figura 18 se observa como las características estudiadas tienen una mediana de 4 tanto al inicio como al final del ensayo. Por su parte, el atributo con menor valor fue la adhesión del chocolate al contacto del consumidor (medida indirecta de que la barra sufre un proceso de derretimiento) la cual obtuvo valores cercanos a 3. Lo cual indica que el chocolate no sufrió procesos de fusión durante su almacenamiento ni al contacto con el consumidor. En este contexto como no hubo variación entre el primer día y el último, se atribuye el defecto a problemas en la producción del producto. Al comparar las dos concentraciones, el chocolate al 85% de cacao muestra un mayor cambio entre las características tras pasar los 182 días, donde el aroma se potenció y hubo un aumento de la adhesión.

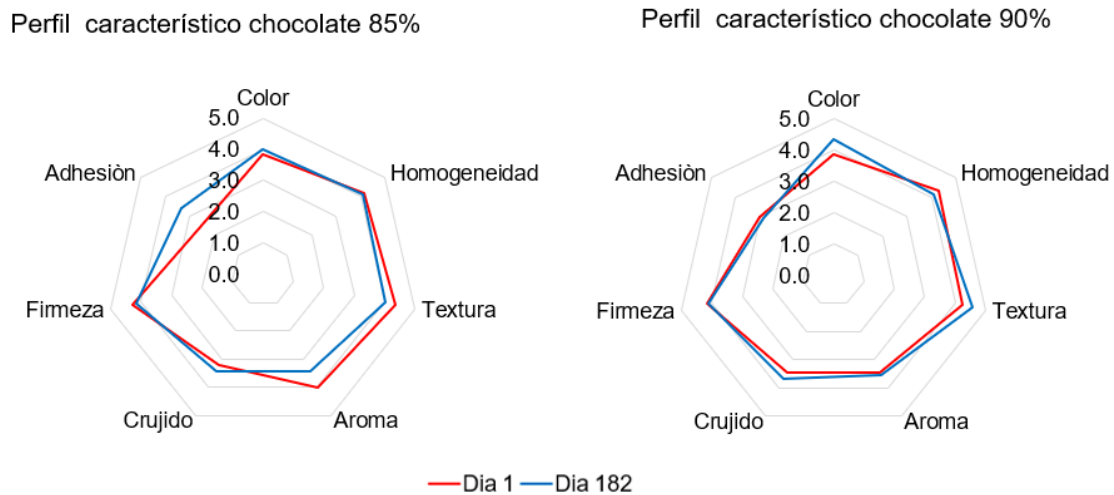


Figura 18. Perfil característico de chocolate al 85% y 90% de chocolate. La percepción se evalúa en una escala de 0 a 5, donde 5 representa una percepción muy fuerte, 4 es fuerte, 3 es moderado, 2 es débil, 1 es apenas reconocible, y 0 es no presenta.

Para el caso del perfil de sabor (Figura 19); los atributos con mayor intensidad fueron los de cacao, amargor, acidez y frutas frescas. Por otra parte, los atributos de flores, especias y frutos secos no estaban marcados en la muestra. Además, se mostró mayor variación

del perfil en las muestras de chocolate al 85%, donde aumenta el sabor a frutas frescas y flores después del tiempo de almacenamiento. En el caso del chocolate al 90%, solo se encontró un aumento de los sabores que ya poseía en la primera medición.

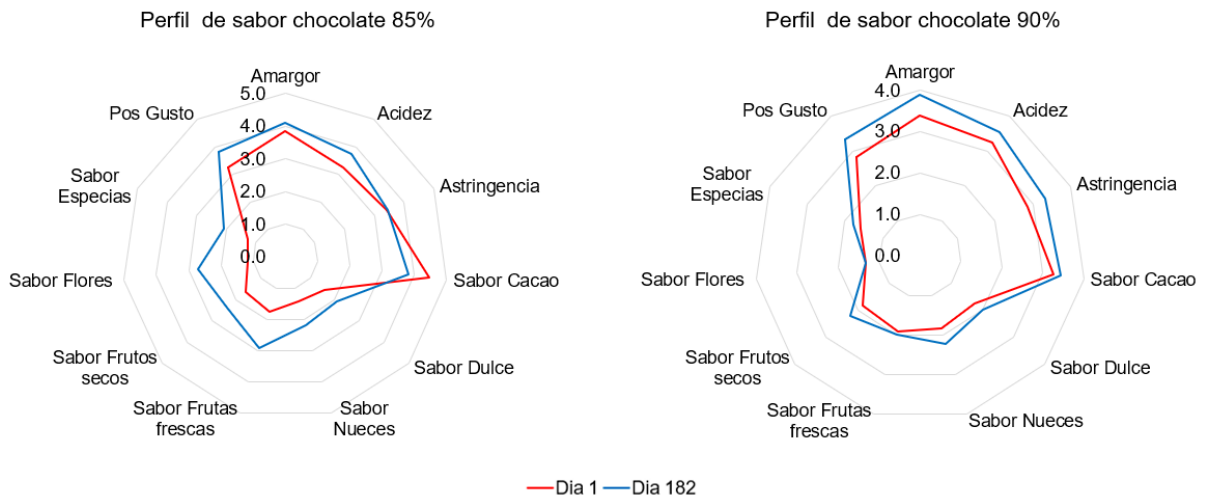


Figura 19. Perfil de sabor del chocolate al 85% y al 90% de cacao. La percepción se evalúa en una escala de 0 a 5, donde 5 representa una percepción muy fuerte, 4 es fuerte, 3 es moderado, 2 es débil, 1 es apenas reconocible, y 0 es no presenta.

El perfil de defectos (Figura 20), muestra una mayor intensidad para los atributos agrio, tierra y rancidez, siendo el atributo de hongos el de menor percepción. Con lo cual, se pudo notar que se han percibido atributos de defectos en las muestras, pero no sobrepasan la mediana de 2, lo cual significa que la intensidad va de no presente a débil.

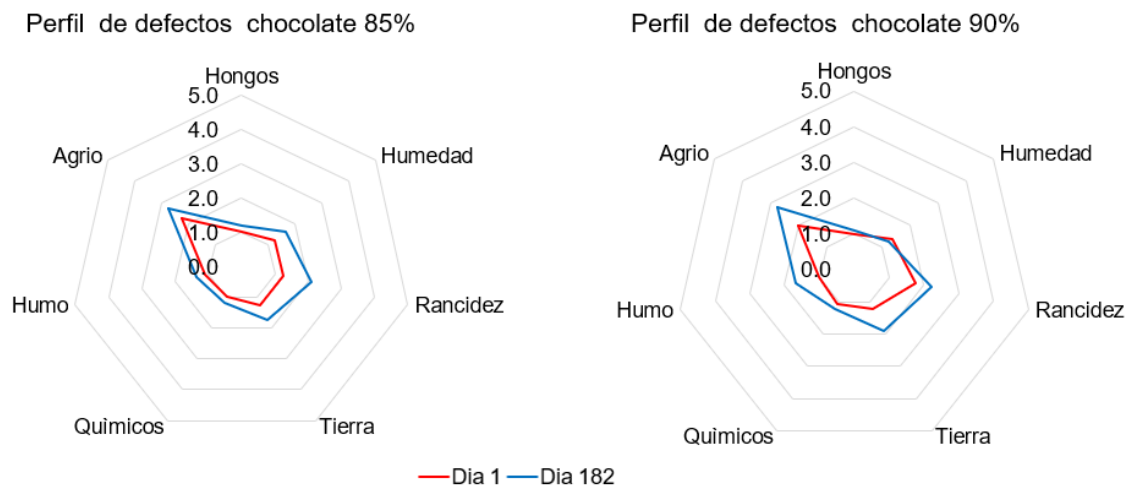


Figura 20. Perfil característico, de sabor y defectos de chocolate al 85% y 90% de cacao empacado en PHBV. La percepción se evalúa en una escala de 0 a 5, donde 5 representa una percepción muy fuerte, 4 es fuerte, 3 es moderado, 2 es débil, 1 es apenas reconocible y 0 es no presenta.

3.3 Conclusiones

En cuanto a los valores obtenidos en los ensayos mecánicos, se pudo observar que, a mayor proporción de PLA, las películas aumentaron su rigidez y disminuyeron su deformación; esto es clave al momento de la disposición que se desea para el empaque, ya que si se desean empaques flexibles se debe disminuir la proporción de PLA y por el contrario se desea un empaque rígido, la proporción de PLA debe aumentar.

Al comparar las muestras obtenidas por extrusión y *solvent casting*, se encontró que al utilizar la extrusión como método de mezcla se mejoran las propiedades mecánicas (deformación de ruptura, esfuerzo de rotura y módulo elástico) y las propiedades de barrera (absorción al agua, hidrofobicidad y permeabilidad al vapor de agua). Lo cual se atribuye a que en la extrusión se mejora la dispersión y distribución de los polímeros, y se manejan temperaturas que permiten una mayor interacción entre los polímeros, lo que genera una mayor homogeneización de la mezcla PHBV/PLA la cual se logró observar en la microscopia.

Tanto para *solvent casting* (1.4%) como para extrusión (0.3%), los porcentajes de absorción de agua fueron bajos, indicando una baja afinidad de los polímeros de la película

con el agua. Esto se respalda con la medición de la hidrofobicidad donde los valores para las películas de PHBV/PLA oscilan entre 70° y 105° (disminuye con la proporción de PLA), cercanos al del PP (99.5°). Lo cual lleva a concluir que estas películas son aptas para el envasado de frutas, ya que su baja absorción de agua contribuye a reducir la proliferación microbiana en la estructura de estos materiales.

Por otra parte, la mezcla 50/50 PHBV/PLA mostró valores la permeabilidad al vapor de agua menores que los obtenidos para los componentes puros. Además, las películas obtuvieron valores mejores que los del PE-HD y PP, aunque no tanto como los de la PA, material utilizado en empaque de frutas por sus propiedades de barrera. Lo cual ofrece la posibilidad de utilizar aditivos para disminuir los valores de permeabilidad con el fin de alcanzar los de la PA.

La baja permeabilidad al oxígeno obtenida para las películas PHBV proporcionaron un empaque ideal para el empaque de productos que se puedan contaminar con olores como el chocolate, en este último se encontró que después de 182 días de empaque, no se modificaron sus propiedades características y de sabor, al igual que no se observaron defectos en el sabor por el empaque.

4. Esterificación de la microcelulosa

Considerando los resultados obtenidos para las películas de PHBV/PLA en el capítulo anterior, se propone la incorporación de aditivos de refuerzo, como la microcelulosa esterificada (MC-Est), para mejorar la compatibilidad entre los polímeros y potenciar las propiedades de barrera. Cabe destacar que en la literatura se reportan una gran cantidad de ejemplos de cómo esterificar la microcelulosa (MC), los cuales en su mayoría utilizan la reacción de acetilación. Sin embargo, estos estudios no establecen las condiciones óptimas para esta reacción, sobre todo teniendo como propiedad de seguimiento la hidrofobicidad generada. Por lo tanto, en este capítulo se muestra la optimización de variables como el tiempo, la temperatura y el agente acetilante, donde el principal mecanismo de seguimiento fue el grado de sustitución (GS) obtenido por infrarrojo y la hidrofobicidad obtenida con el ángulo de contacto. Con el fin de obtener MC-Est suficiente para investigaciones escala piloto.

4.1 Introducción

Las películas de PHBV/PLA han demostrado tener buenas características, sin embargo, para alcanzar las propiedades de polímeros comerciales como el PP y la PA, se requiere de la mejora de sus propiedades, por lo cual, es importante el uso de aditivos de refuerzos que puedan llegar a utilizarse a una escala industrial. De ahí que se estudie la producción de microcelulosa esterificada (MC-Est) como aditivo en materiales de envasado, es importante destacar la importancia de la producción a gran escala de este aditivo, ya que el principal objetivo de este trabajo es el uso de las películas biodegradables de PHBV/PLA/MC-Est en la industria de empaques de Colombia.

Teniendo en cuenta lo anterior, en un trabajo previo llevado a cabo por Ariza, se empleó MC-Est como aditivo en películas de PLA, lo que resultó en una reducción en la permeabilidad tanto al agua como al oxígeno.³³ Estos estudios evidencian el potencial de la celulosa acetilada como aditivo en los materiales de envasado para mejorar propiedades como la resistencia mecánica y las propiedades de barrera. El objetivo es obtener materiales poliméricos con una alta hidrofobicidad y permeabilidad equiparable a la poliamida (PA), además de incrementar la resistencia y el módulo elástico. Adicionalmente, se enfatiza la preferencia por el uso de MC-Est en lugar de la MC, debido a que esta última presenta una menor dispersión en las películas, generando aglomeraciones debido a su carácter hidrofílico.⁵³ Por ende, cobra relevancia la funcionalización de la celulosa.

Para la esterificación de la celulosa, se han propuesto diversos mecanismos, entre ellos la esterificación con ácidos orgánicos como el ácido acético, propiónico, caproico, cáprico, málico, entre otros.²⁹ Con el objetivo de mejorar la eficiencia de esta reacción, se ha

recurrido al empleo de derivados de ácidos, como los anhídridos y cloruros de ácido, dentro de los cuales el más utilizados es el anhídrido acético. También se ha resaltado el uso de diversos catalizadores para esta reacción, entre los más comunes se encuentran el ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, ácidos fuertes altamente corrosivos, así como la utilización de disolventes orgánicos inflamables o tóxicos, como la piridina. Por lo cual, si se quiere escalar el proceso es crucial considerar el uso de otras alternativas, en este sentido, se ha encontrado que los α -hidroxiácidos, como el ácido láctico, tartárico, y cítrico. Los cuales tienen buenos resultados como catalizadores de esta reacción. Un estudio realizado por Ávila señaló que entre estos α -hidroxiácidos, el ácido cítrico ofrecía los mejores resultados en términos de grado de sustitución (GS).³⁰ Por lo cual, en este trabajo se estudiaron las condiciones de reacción (tiempo y temperatura) de la reacción de esterificación de MC con anhídrido acético teniendo como catalizador el ácido cítrico, y su efecto en el GS y el ángulo de contacto. Finalmente, se evaluó la influencia del tamaño de partícula en la hidrofobicidad de la celulosa durante el proceso de esterificación. Todo esto se realizó con el fin de estandarizar un proceso capaz de producir MC-Est con características homogéneas y con alto valor en el mercado como aditivo para empaques biodegradables.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Evaluación de las condiciones de reacción

Análisis estructural por FTIR

Los espectros tomados a las muestras de MC modificada (MC-Est) y sin modificar se encuentran en la Figura 21. En este caso, se utilizó la metodología mencionada en el capítulo 2, en la cual se obtuvo el grado de sustitución utilizando las vibraciones del grupo éster; estas aparecen en 1736 cm^{-1} (C=O) y 1162 cm^{-1} (C-O). Los resultados muestran como la señal del grupo éster (indicativo de reacción exitosa) fue más pronunciada al aumentar la temperatura de reacción, por lo que se pudo notar una relación entre la temperatura de reacción y la cantidad de grupos éster adicionados a la celulosa. El tiempo de reacción también generó un cambio en esta señal; sin embargo, este no fue tan notable como el generado con la variación de la temperatura.

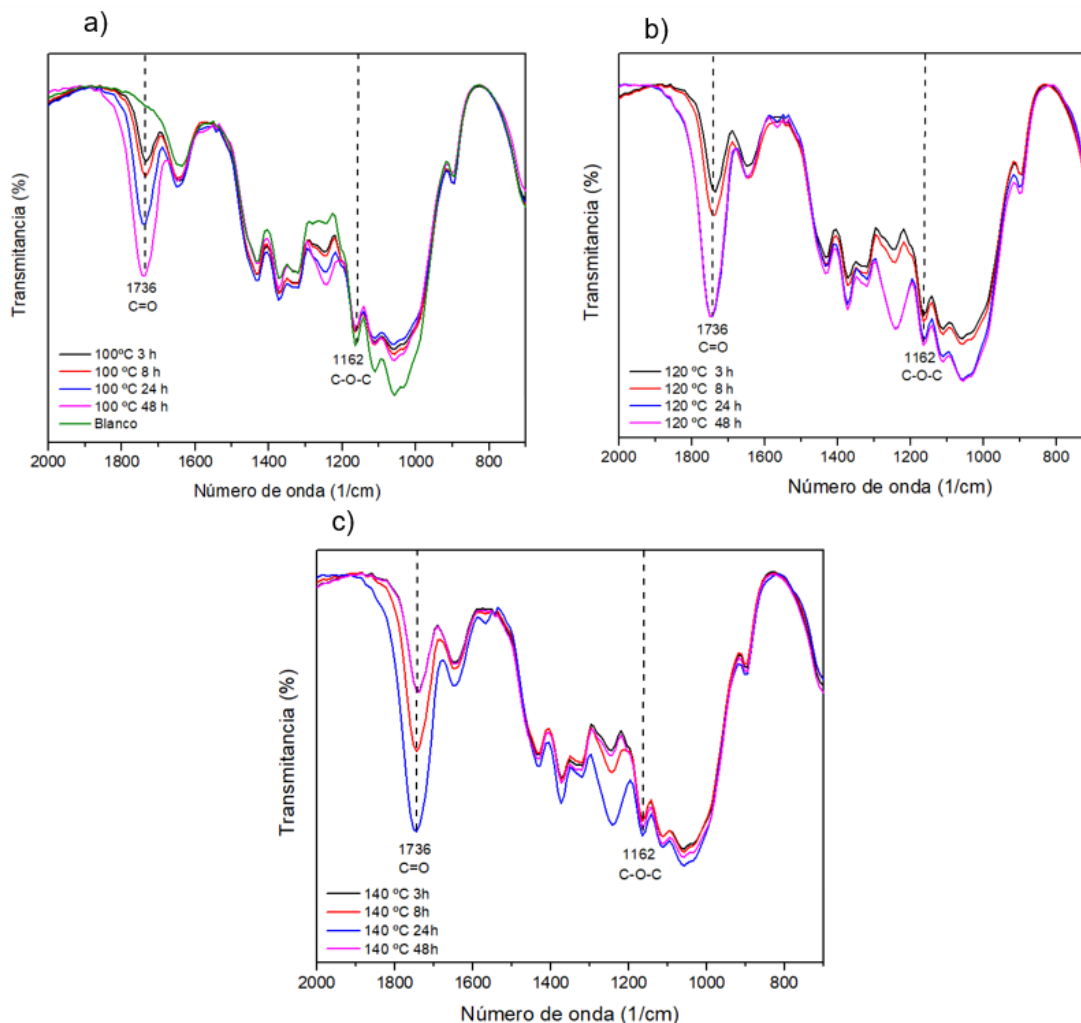


Figura 21. Espectros de la MC-Est variando el tiempo de reacción de acetilación a temperaturas de a) 100°C, b) 120°C, y c) 140°C.

Teniendo en cuenta los espectros FTIR obtenidos para las diferentes condiciones, se calculó el GS mediante la Ecuación 3, dando como resultado los valores mostrados en la Figura 22. En estos, se evidencia como el GS aumenta con la temperatura de reacción a tiempos menores a 24 horas, siendo 2.7 el valor de GS más alto, el cual se obtuvo a 140°C y 24 h. A tiempos de 48 h se generó una disminución de los GS; debido posiblemente a la descomposición de la MC-Est por las altas temperaturas y los tiempos prolongados de reacción, como se puede notar en las condiciones de 140°C y 48 h con el cual se tuvo un GS de 1.

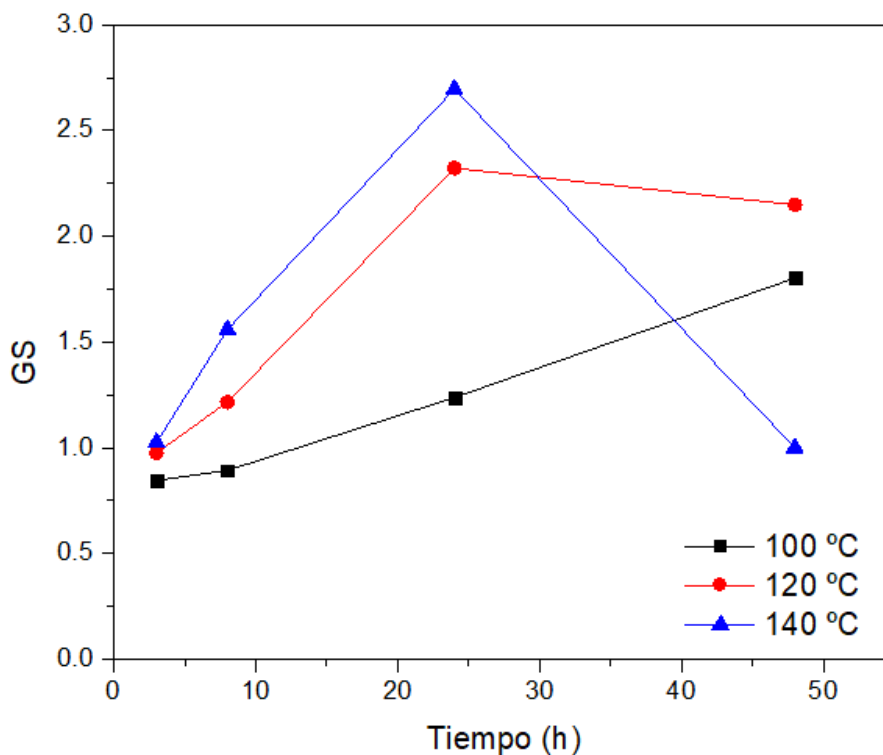


Figura 22. Grado de sustitución (GS) de la MC-Est en función del tiempo y la temperatura de reacción.

Por otra parte, los resultados de hidrofobicidad, evaluados a través del ángulo de contacto (Figura 23), exhiben notables mejoras en comparación con la MC prístina sin funcionalizar, que presenta un ángulo de contacto de cero, indicando total hidrofiliidad. Dando a entender que el logro de obtener valores superiores a 100° para la MC-Est es significativo. Al analizar las condiciones de la reacción, se muestra una disminución del ángulo de contacto con el incremento de la temperatura de reacción. Se observa que a 100°C se obtienen los ángulos de contacto más altos. Cabe destacar que las muestras obtenidas a 120°C y 140°C en un tiempo de reacción de 24 h presentaron una absorción de la gota en un tiempo inferior a 60 segundos (tiempo dejado para el equilibrio entre la gota y la superficie antes de medir el valor del ángulo), lo cual significa, que su acción hidrofóbica no es estable. Este fenómeno se puede atribuir al alto grado de sustitución de esta molécula ya que al funcionalizar todos los grupos OH, se produce el efecto contrario, y la molécula muestra un comportamiento más hidrofílico. Esta hipótesis encuentra respaldo en estudios que reportan bajos ángulo de contacto de la celulosa funcionalizada con altos grados de GS.⁹⁰

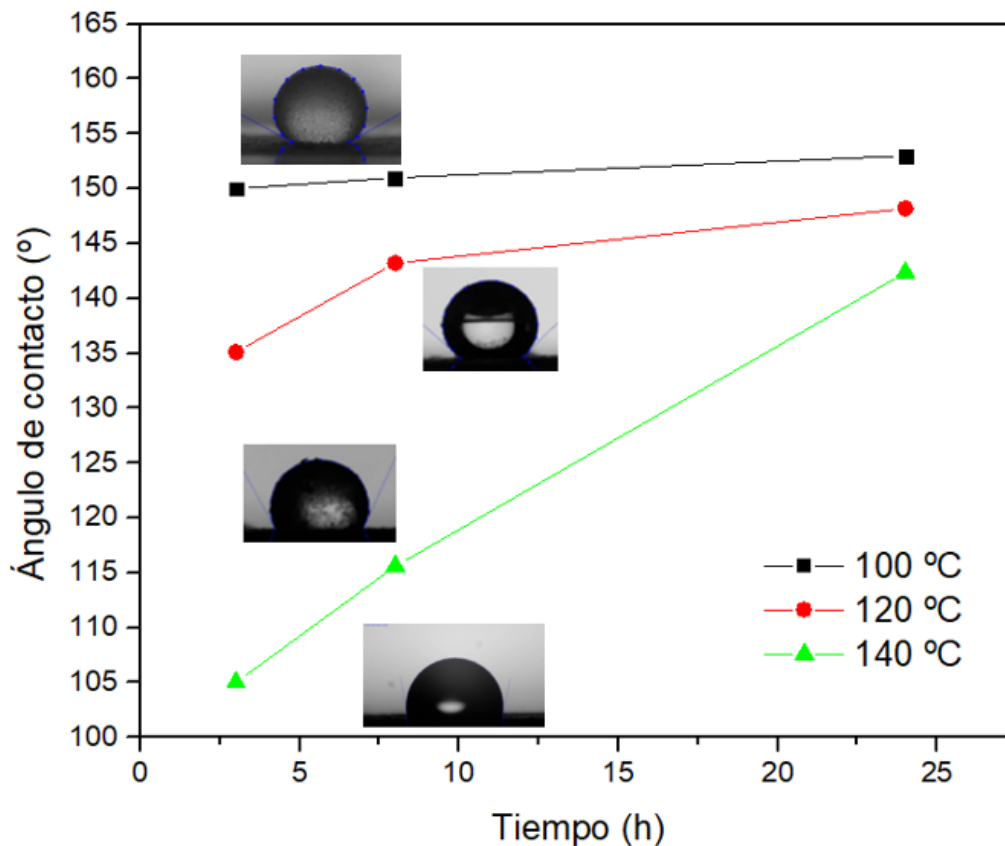


Figura 23. Ángulo de contacto de la MC-Est en función del tiempo y la temperatura de reacción. Donde la MC sin funcionalizar tiene un ángulo de contacto de 0°.

Al examinar tanto el GS (Figura 22) como el ángulo de contacto (Figura 23), se constata la ausencia de una tendencia clara entre estas dos propiedades, lo cual dificulta la correlación de los valores obtenidos. En este sentido, al elegir las condiciones de escalado, se otorga prioridad a los valores obtenidos para el ángulo de contacto, tomando en consideración que la MC sin funcionalizar exhibe un ángulo de contacto de cero. Tras analizar los resultados obtenidos, se opta por una temperatura de escalado de 100°C, ya que demostró proporcionar los ángulos de contacto más elevados. En cuanto al tiempo, no se observa una diferencia significativa entre los diferentes intervalos temporales cuando la reacción se lleva a 100°C. Sin embargo, a temperaturas más elevadas, se percibe un aumento en el ángulo de contacto con el tiempo de reacción.

4.2.2 Caracterización de productos GS variable

Propiedades térmicas

Mediante termogravimetría (TGA) y la derivada de la termogravimetría (DTG) se determinó el impacto de la temperatura de reacción sobre la estabilidad térmica de la MC-Est (Figura 24). Para este caso se compararon las muestras de MC-Est obtenidas con la temperatura de reacción más alta (140°C) y más baja (100°C). En estos termogramas se evidenciaron dos pérdidas de peso importante, la primera a temperaturas menores a 100°C, lo cual se atribuye a la deshidratación de la muestra y posterior a esta, se encontró una pérdida del 75% de la masa atribuida a la descomposición de la MC y MC-Est, este comportamiento se dio a los 300°C.

Al comparar el DTG, se observó como las dos muestras de MC-Est presentan la misma estabilidad térmica que la muestra de MC sin acetilar. Es relevante señalar que, según literatura, un aumento en la acetilación suele llevar a una disminución en la estabilidad térmica.³⁰ Como resultado, queda claro que la acetilación realizada en este estudio no afectó la estabilidad de las partículas, lo cual es de gran relevancia, ya que permite utilizar la MC-Est en procesos de extrusión.

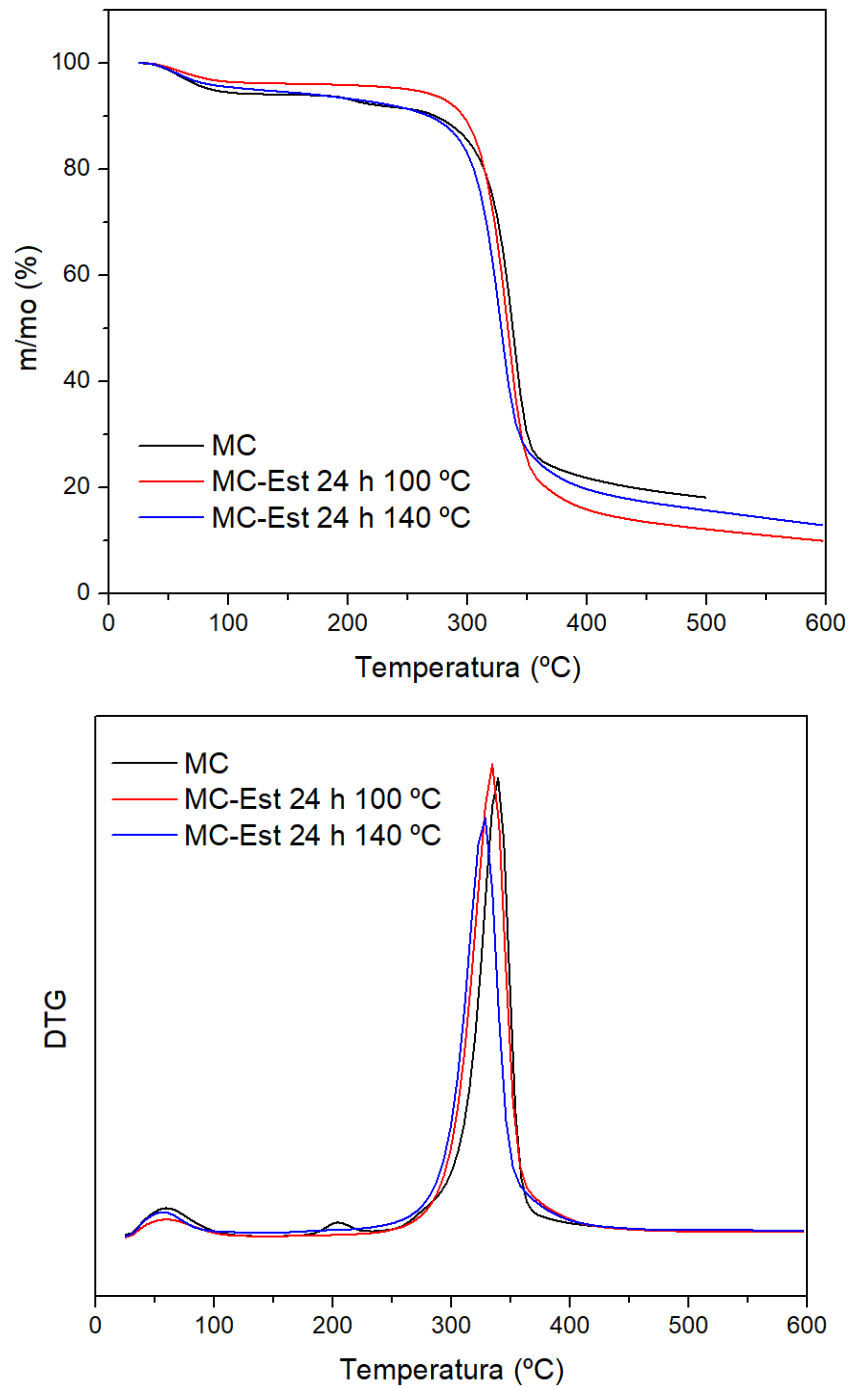


Figura 24. Curvas de TGA y DTG para MC pura y MC-Est obtenidas con temperatura de reacción a 100°C y 140°C, y tiempo de reacción de 24 h.

4.2.3 Optimización de agente de acetilación

Al buscar en literatura las proporciones MC/anhidrido acético (AA) utilizadas en las reacciones de esterificación, se observó que están oscilan entre 0.01 y 0.14 (p/v).^{30,106}

Contrariamente, en este estudio, se empezaron con proporciones de 0.1 y se alcanzaron proporciones de 0.5 MC/AA con resultados de ángulo de contacto y grado de sustitución prometedoros (Tabla 17). Este hallazgo es destacable, ya que una de las pretensiones más importantes en este trabajo es el escalado, donde la reducción de la cantidad de materia prima requerida en el proceso es una prioridad. También cabe señalar que el AA cumple dos roles en la reacción: actúa como agente de acetilación y como solvente, facilitando una mayor interacción entre el catalizador, el AA y la MC.

Es esencial resaltar que la mayoría de los estudios encontrados sobre la acetilación con AA están catalizados con ácido sulfúrico, obteniendo grados de sustitución superiores a 2.6,^{90,106-108} aunque estos presentan ángulos de contacto que se encuentran desde 58.4 a 101.5°.^{90,107} También se informan valores de ángulo de contacto (68.6°) y GS (2.45) para una muestra de celulosa acetilada comercial. Al analizar estos datos, se observa que los ángulos de contacto son inferiores a los obtenidos en esta tesis, a pesar de que los GS son mayores en la literatura. Este hallazgo sugiere que el ángulo de contacto no guarda una relación directa con el GS, respaldando los datos obtenidos en la evaluación de condiciones de reacción. Además, cabe destacar el uso de ácido cítrico como catalizador, un compuesto biodegradable y no tóxico que causa un menor impacto ambiental y genera compuestos con mayor hidrofobicidad.

Tabla 17. Optimización de agente de acetilación anhídrido acético (AA) teniendo como catalizador el ácido cítrico.

Condiciones			GS	Angulo de contacto
Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Proporción MC/AA (p/v)		
100°C	8	0.10	0.90	153°
100°C	24	0.10	1.24	153°
100°C	24	0.14	1.50	145°
100°C	3	0.33	1.60	143°
100°C	8	0.50	1.62	151°
100°C	24	0.50	2.4	125°
100°C	24	0.60	2.6	0

Los resultados previos indican que una proporción 0.5 p/v de MC/AA con un tiempo de reacción de 8 h, es óptima. Más allá de este valor de concentración MC/AA, se pierde por

completo la hidrofobicidad del material, como se evidencia en la concentración de 0.6 p/v, que muestra un ángulo de contacto de cero. Esto sugiere que, debido a la reducción de solvente (función desempeñada por el AA), se produce una mayor acetilación, haciendo que la molécula se vuelva más hidrofílica, como se mencionó anteriormente. Por otra parte, la MC obtenida en proporciones de 0.6 p/v de MC/AA presenta una coloración marrón, y la limpieza de este material requirió más lavados con solvente, sin lograr cambios en la coloración, lo que conlleva a una disminución de la calidad de la MC-Est. En consecuencia, aumentar la proporción 0.5 p/v no es factible, tanto desde el punto visual como por el ángulo de contacto obtenido.

Una vez identificada la proporción adecuada de MC/AA, se evaluaron dos tiempos de reacción (8 y 24 h), notando que a medida que se incrementaba el tiempo de reacción, el ángulo de contacto disminuía. Además, al reducir el tiempo de reacción, se observó que el aspecto visual de la MC-Est era mejor a las 8 h que a las 24 h. En consecuencia, se llevó a cabo la reacción a escala mayor, utilizando 100 g de MC a 100°C durante 8 h.

4.2.4 Análisis de tamaño de partícula

Uno de los factores más importantes de un aditivo es su dispersión en la película polimérica, el cual depende en gran parte del tamaño de partícula; por lo tanto, al evaluar el tamaño de partícula de la MC y MC-Est, se encontró que la mayoría del material se situaba en el rango de 15 a 97 μm , y esto llevaba a la formación de gránulos en la película. Tras someter la MC a molienda y tamizaje se logró alcanzar tamaños que oscilan aproximadamente a la mitad de este intervalo (4.8-45.3 μm), tamaños medidos con un analizador de partícula laser PSA 1190.

Con el propósito de determinar si el tamaño de partícula influye en la hidrofobicidad, se llevó a cabo la reacción de esterificación utilizando dos muestras: una con la MC molida y tamizada (MC-Est MT prev) y otra con la MC sin ningún tratamiento (MC-Est sin MT prev), esta última fue posteriormente molida y tamizada, resultando en la muestra denominada "MC-Est MT". Se procedió a medir el tamaño de partícula de estas tres muestras de MC-Est y se compararon con los valores obtenidos para la MC, las distribuciones obtenidas se muestran en la Figura 25 donde MT simboliza los procesos de molienda y tamizaje.

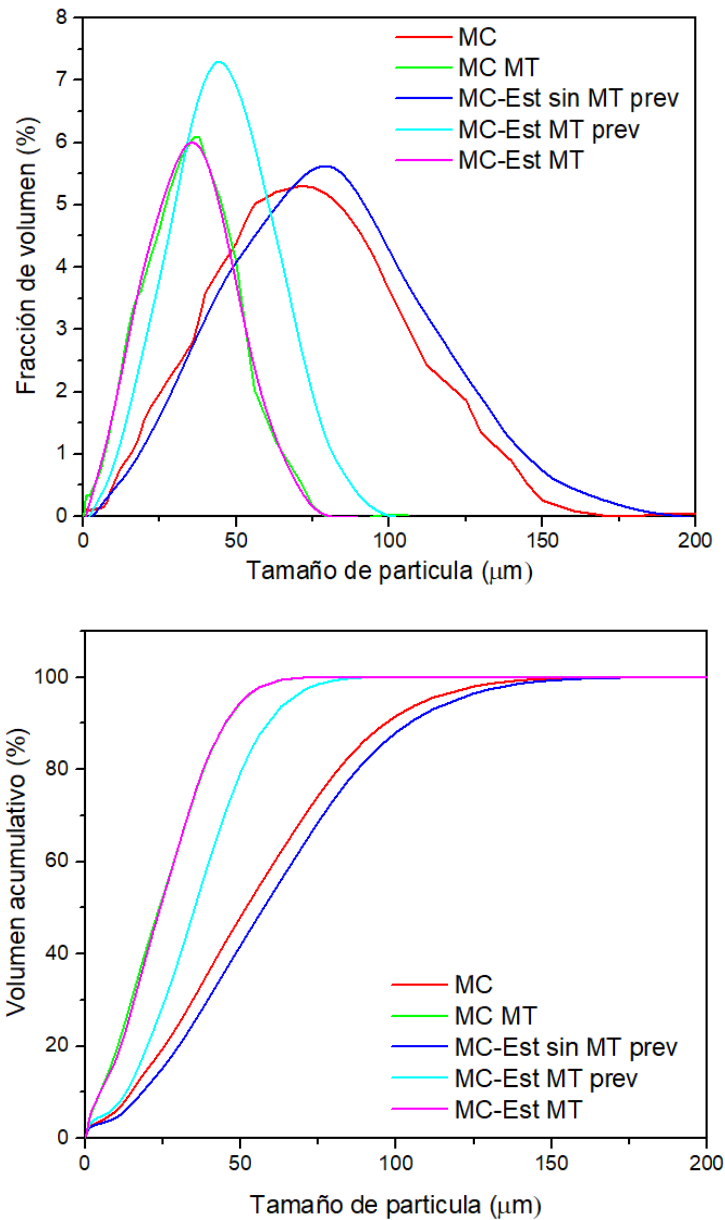


Figura 25. Distribución de tamaño de partículas de MC y MC-Est, donde MT simboliza el proceso de molienda y tamizaje, y “prev” si se realizó previamente al proceso de funcionalización.

Las distribuciones indican que el proceso de molienda y tamizaje tiene un efecto similar tanto en la MC como en la MC-Est, como se puede apreciar en la Figura 25, donde las muestras MC MT y MC-Est MT muestran la misma distribución. Por otra parte, se observa que la MC-Est tiende a aumentar su tamaño de partícula durante la funcionalización, fenómeno que ocurre en mayor medida cuando se realiza la molienda y tamizaje de la MC antes de la reacción. Esto se evidencia al comparar las distribuciones de la muestra MC

MT (línea verde) con la muestra MC-Est MT prev (línea aguamarina), en la cual se registra un aumento en el tamaño de partícula. Se observa un efecto similar al funcionalizar la MC sin tratamiento, como se aprecia al comparar las muestras de MC (línea roja) y MC-Est sin MT prev (línea azul), aunque en este caso la diferencia no es tan significativa como en el de la MC MT.

Por otra parte, al analizar los datos de las distribuciones, que incluyen el D50 (tamaño de partícula medio), el D10 (límite inferior) y D90 (límite superior) del rango de tamaño de partícula de las muestras, junto con la dispersión de la distribución (Tabla 18), se destaca con mayor claridad el aumento del tamaño de partícula después de la acetilación. Haciendo énfasis en que, los materiales que han pasado por procesos de molienda y tamizaje muestran una diferencia más significativa en comparación con aquellos sin estos tratamientos. Este hecho se respalda con el aumento del D50 en 4.9 μm al funcionalizar la MC, en contraste con el incremento de 11.3 al funcionalizar la MC MT.

Al comparar las distintas muestras de MC-Est, se destaca que la MC-Est MT presenta el D50 más bajo, seguido por la “MC-Est MT prev”, y por último se tiene el MC-Est sin MT prev. Aunque en la muestra “MC-Est MT prev” se evidencia una menor dispersión en la distribución, indicando una mayor concentración de partículas alrededor del D50 en comparación con las demás muestras, este fenómeno se aprecia claramente en el incremento de la fracción de volumen por parte de esta muestra en la distribución en la Figura 25. En resumen, se confirma que el proceso de molienda y tamizaje ayuda a reducir el tamaño de partícula, ya sea aplicado antes o después de la funcionalización, obteniéndose resultados más favorables en termino de tamaño de partícula cuando se realiza posterior a la reacción y con menor dispersión cuando se realiza antes.

Tabla 18. Tamaño de partícula de muestras de MC y MC-Est.

Muestra	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	Dispersión de la distribución
	μm	μm	μm	
MC	15.3 \pm 0.4	52.5 \pm 1.0	97.7 \pm 1.2	1.6
MC MT	4.8 \pm 0.4	23.7 \pm 0.6	45.3 \pm 0.7	1.7
MC-Est sin MT prev	18.4 \pm 0.7	57.4 \pm 0.8	104.1 \pm 0.8	1.5
MC-Est MT prev	13.0 \pm 0.6	35.0 \pm 0.2	58.7 \pm 0.3	1.3
MC-Est MT	4.8 \pm 0.4	24.2 \pm 0.8	45.0 \pm 1.1	1.7

También es crucial señalar que, al evaluar el ángulo de contacto de estas muestras, se encontró que al moler y tamizar la MC después del proceso de funcionalización (MC-Est MT), pierde su carácter hidrofóbico. Como se detalla en la Tabla 19, al utilizar una muestra molida y tamizada después de la funcionalización MC-Est MT, el valor de ángulo de contacto es de 0°, sin embargo, al molerla y tamizarla antes de la reacción (MC-Est MT prev) se alcanza valores de 151°. Además, se notó que al reducir el tamaño de partícula antes de la reacción de acetilación (MC-Est MT prev), el ángulo de contacto aumentó en un 4.4% en comparación con la muestra no tamizada previamente (MC-Est sin MT prev). Este hallazgo sugiere que el tratamiento más efectivo para la MC fue la molienda y tamizado previos a la reacción de esterificación, logrando así un ángulo de contacto más elevado y un tamaño de partícula inferior al obtenido al funcionalizar la MC comercial.

Tabla 19. Angulo de contacto de MC y MC-Est después de proceso de molienda y tamizaje.

Muestra	Angulo de contacto
MC	0°
MC MT	0°
MC-Est sin MT prev 26	144.984° ± 1.231
MC-Est MT prev 27	151.660° ± 1.199
MC-Est MT	0°

La pérdida de hidrofobicidad al moler la MC-Est se atribuye al quiebre de las partículas durante el proceso de molienda. Si tenemos en cuenta que la reacción de esterificación ocurre principalmente en la superficie (zona hidrofóbica) de las partículas de MC, cuando se hace la molienda y tamizado se estarían exponiendo mayoritariamente partes internas de la MC que previamente no fueron esterificadas y que aún tienen altísimo porcentaje de grupos hidroxilo (zona hidrofílica) disponibles para la interacción con la gota de agua (Figura 26).

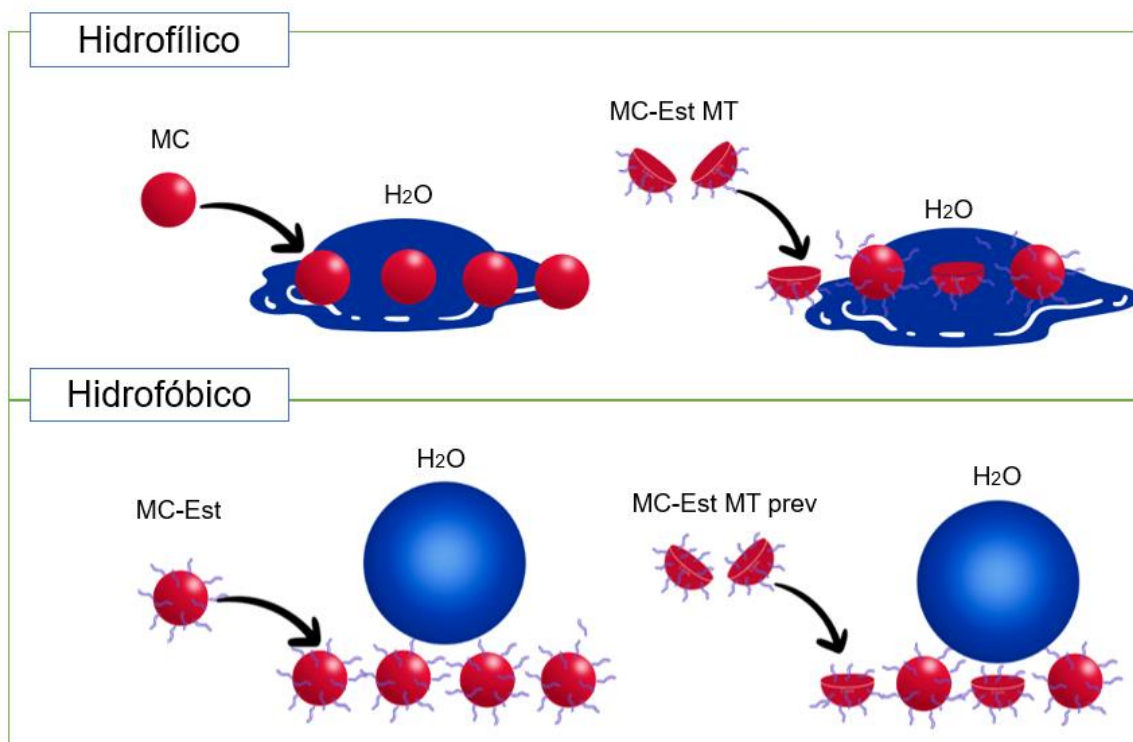


Figura 26. Ilustración de la interacción entre las partículas de MC (esferas rojas completas), MC-Est (esfera roja con hilos morados), MC-Est molida y tamizada (media-esferas rojas) y MC-Est MT prev (media-esferas rojas con hilos morados) con una gota de agua (esfera azul).

4.3 Conclusiones

En relación con los resultados obtenidos en la optimización de la reacción de acetilación sobre la MC, se observó que el grado de sustitución (GS) aumentó con la temperatura; no obstante, para tiempos superiores a 24 horas, el GS disminuyó a temperaturas superiores a 120°C. Los valores de GS oscilaron entre 0.8 (100°C, 3 h) y 2.7 (140°C 24 h), los cuales, comparados a los reportados en la literatura se consideran altos, lo cual muestra que el proceso de optimización de la reacción de esterificación fue exitoso.

Al analizar los valores de ángulo de contacto, se encontró que este tiene un comportamiento contrario al GS, disminuyendo con la temperatura. Se obtuvieron los mejores valores a 100°C y 24 h, pero al compararlos con el obtenido a las 3 h, la diferencia es insignificante, y a su vez, fue mayor que los valores obtenidos para las demás condiciones. La no correlación entre el ángulo de contacto y el GS, no se ha reportado por otros autores, debido a que el mayor el ángulo de contacto encontrado en reportes ha sido

de 101.5° con GS de 2.85, por lo cual se concluyó que el ángulo de contacto aumentaba con el GS, sin embargo, en este trabajo se obtuvieron ángulos de 153° con GS de 0.9 y 1.24, lo cual contradice esa teoría.

El proceso de optimización de la reacción de esterificación, teniendo en cuenta la obtención una MC altamente hidrofóbica, controlada mediante la medición del ángulo de contacto, mostró que las mejores condiciones son 8 h y 100°C utilizando ácido cítrico como catalizador y una proporción de MC/AA de 0.5 % p/v.

La importancia del tamaño de partícula de los aditivos radica en su influencia en la dispersión y distribución dentro de las películas poliméricas, lo que subraya la relevancia de la molienda y tamizaje de la MC. No obstante, se observó que al someter las partículas de MC-Est previamente funcionalizada a molienda y tamizaje, estas perdían su naturaleza hidrofóbica. En contraste, al realizar la molienda y tamizaje antes de la funcionalización, se logró obtener MC-Est con propiedades hidrofóbicas, obteniendo una reducción del tamaño de partícula del 33%, con lo cual se cumple el objetivo de tener MC-Est hidrofóbica con menor tamaño de partícula.

5. Introducción de la microcelulosa funcionalizada (MC-Est) en la matriz polimérica PHBV/PLA

El capítulo 3 se centró en analizar las propiedades de las películas de PHBV/PLA, evaluando el impacto de la proporción de PLA en la mezcla. Se determinó que la mejor proporción para envases rígidos era 50/50 y para flexibles 100/0. Posteriormente, el capítulo 4 presenta las condiciones ideales para la producción de MC-Est altamente hidrofóbica. En este marco, el presente capítulo aborda el estudio de la incorporación de la MC-Est en la matriz de PHBV/PLA 50/50, buscando un refuerzo mecánico que aumente la compatibilidad entre el PHBV y PLA, impactando así, en sus propiedades mecánicas (módulo elástico y esfuerzo de rotura) y de barrera, esto con el fin de alcanzar valores cercanos a los del PP o PET. En el caso de las películas de PHBV, aprovechando la alta hidrofobicidad de la MC-Est, se utiliza como aditivo para reducir la permeabilidad al vapor de agua, buscando alcanzar valores como los de la PA.

5.1 Introducción

Una forma para mejorar la resistencia mecánica en polímeros biodegradables consiste en la adición de micro o nanopartículas, las cuales pueden aumentar la interacción entre los polímeros de la mezcla PHBV/PLA, además de servir como refuerzo mecánico del material. Ting y Yan estudiaron el grado de dispersión y la estabilidad térmica de la NC en PHBV por medio de la acetilación de la NC con anhídrido acético.⁷¹ Modificación química que al remplazar los grupos hidroxilo de la celulosa por grupos acetilo ha mostrado incrementar la hidrofobicidad del material.¹⁰⁹ En este estudio, Ting y Yan encontraron que una matriz de PHBV con 1.2% de NC acetilada aumenta un 44.7 % y 34.5% la resistencia a la flexión y el módulo de flexión, respectivamente, comparados con el PHBV solo.⁷¹ De manera similar, Yu y colaboradores encontraron que la adición de NC acetilada puede disminuir del 58.1% a 39.1 % la cristalinidad del PHBV, pero aumentando la temperatura máxima de descomposición de 259.6 a 266.3°C y el ángulo de contacto de 60.1° a 95.7°, respectivamente, haciendo las películas más hidrofóbicas.⁷² Y aunque los anteriores trabajos muestran resultados obtenidos por *solvent casting*, y no representan el objetivo de la actual tesis de maestría, si muestran que la celulosa puede actuar como compatibilizante entre polímeros como el PHBV y PLA, o como modificador de propiedades fisicoquímicas de estos polímeros.

Interesantemente, estos estudios enunciados se han realizado con NC, la cual es una forma costosa de celulosa que aumenta el valor final del material obtenido, además de presentar problemas de procesabilidad durante la extrusión.²⁸ Por lo anterior, una forma de celulosa poco reportada, de bajo costo, que puede tener mejor procesabilidad por extrusión en mezclas con PHBV es la microcelulosa (MC). En este capítulo, se explora el empleo de la microcelulosa esterificada (MC-Est) como aditivo para potenciar las propiedades mecánicas, específicamente el módulo elástico y el esfuerzo máximo de ruptura, en compósitos de PHBV/PLA en una proporción de 50/50. Además, se busca mejorar la permeabilidad al vapor de agua en las películas de PHBV. Es importante señalar que, en el caso de los envases rígidos, la permeabilidad al vapor de agua puede ser modificada también mediante el ajuste del espesor de la película. Por ende, para los compósitos de PHBV/PLA 50/50, la adición de MC-Est tiene como objetivo principal incrementar la compatibilidad entre ambos polímeros, mejorando así sus propiedades mecánicas. En contraste, en el caso de los polímeros utilizados en envases flexibles, se

requieren propiedades de barrera superiores. Por lo tanto, en las películas de PHBV, el objetivo central consiste en reducir su permeabilidad al vapor.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Películas por *solvent casting*

Se llevaron a cabo ensayos de incorporación de MC-Est en la matriz PHBV/PLA mediante la técnica de *solvent casting* observando la dispersión (homogeneidad del tamaño de las partículas de MC-Est dentro de la película) y distribución (homogeneidad de la MC-Est a lo largo de la película). Al observar estas películas (Figura 27), se notó una coloración mayor sobre la superficie de la película comparada con la observada para películas PHBV/PLA. Esta coloración se atribuyó a una mayor proporción de MC-Est en la superficie superior de la película, debido a que en el tiempo de secado la MC-Est tiende a flotar aumentando su proporción en la superficie.

Al comparar la incorporación de la MC-Est en diferentes proporciones de PHBV/PLA, se observó una mejor distribución de la MC-Est en las películas 50/50 PHBV/PLA. Película que presentó la menor densidad de aglomeraciones en forma de puntos o zonas opacas, como la muestra la Figura 27. Esto indica que la MC-Est ayuda a que el PLA tenga mayor dispersión en la película, haciendo que esta se vea más homogénea.



Figura 27. Aspecto películas de PHBV/PLA/MC-Est realizadas por *solvent casting*.

5.2.2 Películas por extrusión de PHBV/PLA/MC-Est

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el método de *solvent casting*, se esperaba una mejora en la distribución y dispersión al extruir el material. Sin embargo, esto no sucedió, en parte, debido a la diferencia de tamaño entre los pellets de los polímeros de PHBV y PLA y la MC-Est (la cual es un polvo en tamaño de micrómetros), causando que

las partículas de MC-Est se aglomeren y formen capsulas o grumos al ingresar a la extrusora, dando como resultado una baja dispersión de las partículas en la película (Figura 28), y creando puntos de ruptura del material. También se encontró que a lo largo de la película se formaban áreas de varios centímetros con alta cantidad de MC-Est, generalmente presentes en los últimos tramos de película de cada formulación, por lo cual se puede afirmar que tampoco se logró tener una dispersión de la MC-Est en el material obtenido.

Cabe resaltar que, en estos casos, donde el aditivo se encuentra en polvo y su temperatura de fusión es mayor al de las mezclas, generalmente se utiliza una peletización del aditivo, para obtener un *masterbatch* o *primer*, previa a la extrusión, como también se recomienda el uso de una extrusora con doble tornillo.



50/50/1 % MC-Est



100/0/1 % MC-Est

Figura 28. Aspecto películas de PHBV/PLA/MC-Est extruidas.

Debido a los resultados obtenidos en la extrusión con MC-Est al 1%, se optó por utilizar el método de *solvent casting* para producir películas concentradas al 40% de MC-Est, películas que al ser cortadas en un molino de cuchillas produce un material que podríamos considerar un *masterbatch* de MC-Est. Con este *masterbatch* se logró extruir películas PHBV/PLA 50/50 con una mejor dispersión y distribución de la MC-Est como se puede observar en la Figura 29. Es importante resaltar que las películas de la Figura 28 tienen una coloración fuerte a marrón por la adición de un colorante, este se utilizó para diferenciar las formulaciones en la extrusión, por lo cual, solo es comparable el tamaño de las aglomeraciones, las cuales son más pequeñas al realizar el *masterbatch*.

Se elaboraron películas de PHBV/PLA/MC-Est, variando la concentración de la MC-Est en 0.5%, 1%, 1.5% y 2%. Este enfoque tuvo como objetivo analizar el comportamiento mecánico de la mezcla PHBV/PLA con la adición de la MC-Est. Como se mencionó anteriormente, la inclusión de MC-Est se orientó a aumentar la rigidez del material. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de las propiedades barrera a las películas de la mezcla PHBV/PLA 50/50 con adición de MC-Est. Por otra parte, a las películas PHBV/PLA 100/0 se le hicieron adiciones de 1% y 2% de MC-Est, esto con el fin de investigar la posibilidad de disminuir la permeabilidad al vapor de agua de los envases flexibles con la incorporación de la MC-Est, ya que se busca utilizar estas películas como alternativas a la PA.

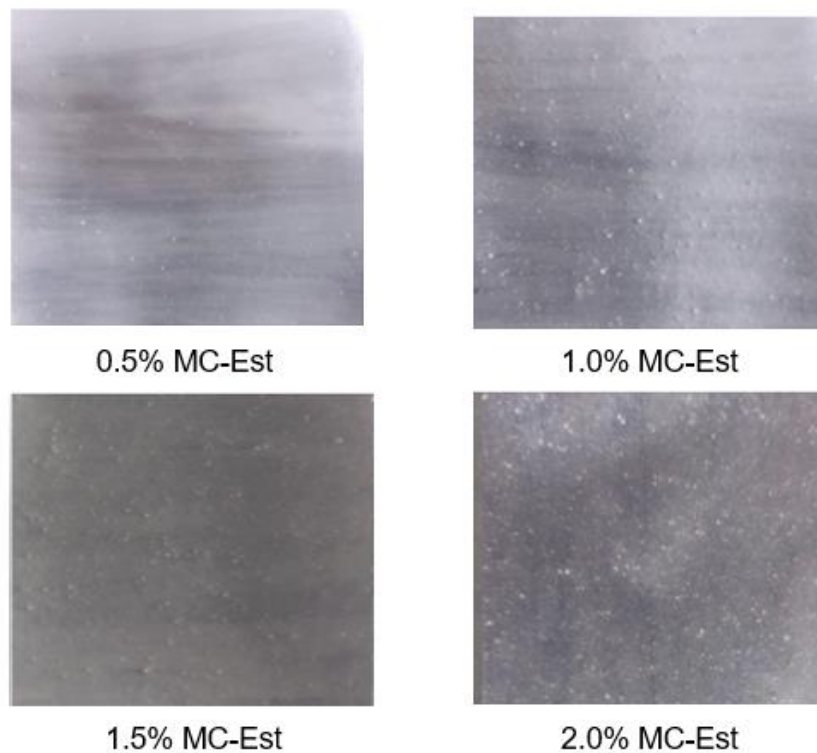


Figura 29. Películas de PHBV/PLA 50/50 extruidas variando la cantidad de MC- Est.

5.2.3 Caracterización películas PHBV/PLA/MC-Est

Propiedades mecánicas

Al realizar los ensayos de tensión-deformación en las películas de PHBV/PLA/MC-Est obtenidas por *solvent casting*, se evidenció una mayor resistencia al esfuerzo en

comparación con las películas PHBV/PLA. Las películas con menor proporción de PLA, como 50/50/1 y 60/40/1, mostraron baja deformación al esfuerzo, indicando una mayor rigidez del material. Las curvas de esfuerzo-deformación de las películas PHBV/PLA/MC-Est, obtenidas mediante extrusión (sin usar *masterbatch*), se presentan en la Figura 30. En estas curvas, se destaca una disminución en el esfuerzo y un aumento en la deformación en comparación con las curvas obtenidas para PHB/PLA. Este cambio en el comportamiento puede atribuirse al incremento de las interacciones intracadena, que confieren mayor flexibilidad al material. Además, se observa que el polímero experimenta una ruptura sin prolongación, atribuida a los puntos de ruptura por parte de la MC-Est, como se evidenció anteriormente en la Figura 29. Por lo tanto, cuando se produce el encuellamiento cerca de una aglomeración, se desencadena la ruptura del material.

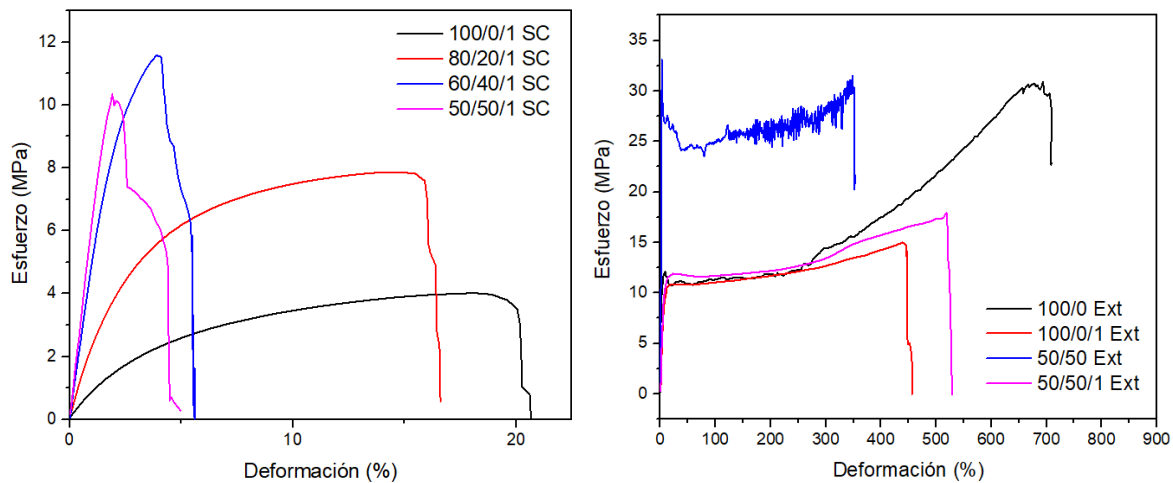


Figura 30. Curvas de esfuerzo-deformación de PHA/PLA/MC-Est fabricadas por a) *Solvent casting* y b) Extrusión con corte longitudinal.

Cuando se utilizó el *masterbatch* de MC-Est, se observó que el esfuerzo necesario para deformar la película fue significativamente mayor que en aquellas donde no se aplicó este método, como se observa en la Figura 30 las películas con MC-Est alcanzaron esfuerzos de máximo 18 MPa por el contrario en las películas de la Figura 31 se obtuvieron en su mayoría esfuerzos de alrededor de 35 MPa. No obstante, al aumentar la dispersión de la MC-Est dentro de la película, se incrementaron los puntos de ruptura, lo que resultó en una menor deformación en proporciones superiores al 0.5%.

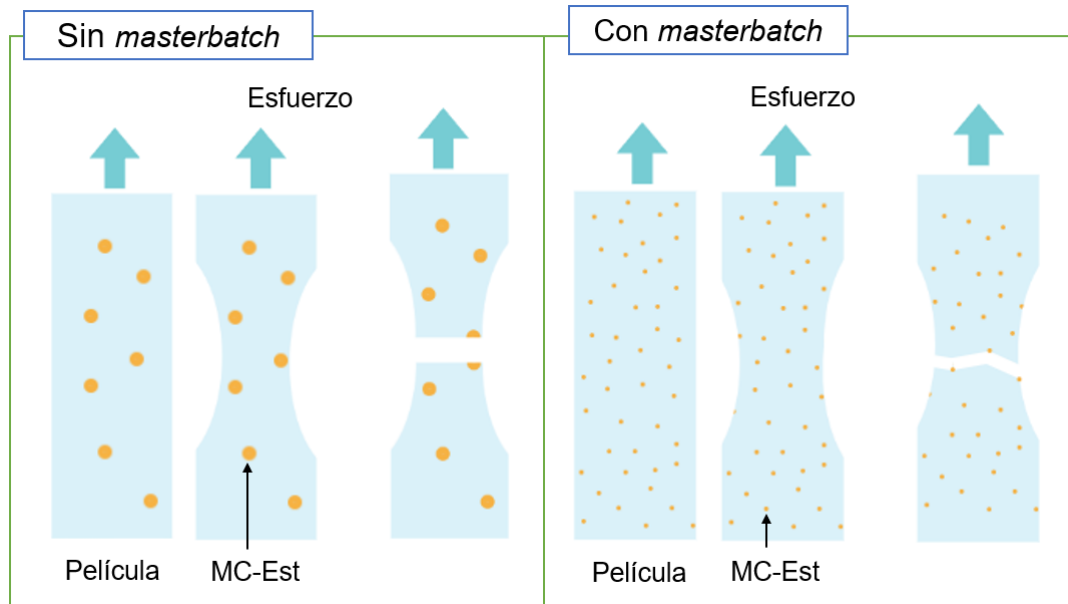


Figura 31. Ruptura de las películas con y sin *masterbatch*.

Por otra parte, se encontró que la proporción de 0.5% no mostraba este mismo comportamiento, si no que, por el contrario, la adición de la microcelulosa producía una disminución del esfuerzo de rotura y un aumento de la deformación con respecto a las otras formulaciones, haciéndola más flexible (Figura 32).

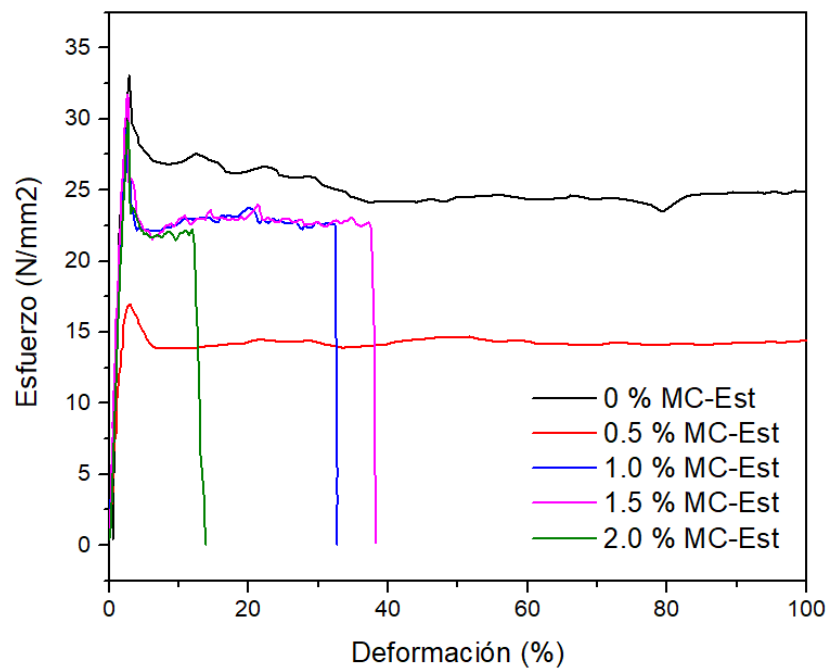


Figura 32. Curvas de esfuerzo vs deformación de las películas PHBV/PLA 50/50 variando proporción de MC-Est.

Las propiedades de tracción de las películas se detallan en la Tabla 20, revelando que la adición de MC-Est al 0.5 % resulta en la disminución del módulo elástico y esfuerzo de rotura, más allá de esta cantidad, la MC-Est causa el efecto opuesto. Este fenómeno es contrario al observado en estudios con NC, donde la adición de 0.25 a 0.5% de cristales de NC, logra un esfuerzo de rotura y un módulo elástico de 104.02% y 27.74% más altos que los obtenidos por base sola 70/30 PLA/PHBV. Más allá de estos valores, se evidenció una disminución gradual de las propiedades de flexión con el aumento de la NC.⁶⁶ Lo cual no se observó en este trabajo, donde se mantuvieron los valores de esfuerzo de rotura y módulo elástico con el aumento de MC-Est, y en proporciones del 1.5% se aumentaron estos valores.

Tabla 20. Propiedades mecánicas de películas PHBV/PLA/MC- Est.

Proporción PHBV/PLA/MC-Est	Esfuerzo de rotura	Deformación de rotura	Módulo elástico
	MPa	%	MPa
50/50/0	31.59	340.61	1.15
50/50/0.5	22.70	413.26	0.63
50/50/1.0	29.49	32.33	1.13
50/50/1.5	31.72	37.18	1.19
50/50/2.0	29.83	11.88	1.11
PP ⁵⁵	31-45	50-145	1.95
PET ⁵⁵	62	230	9.35
PE-LD ⁵⁵	30	200-600	0.26-0.5
PA ⁵⁵	34	800	25

Al comparar los resultados de las películas con los polímeros de uso industrial, se nota un comportamiento similar al del PP y PE. Donde la proporción de 0.5% exhibe un comportamiento más flexible similar al del PE, mientras que proporciones mayores muestran un comportamiento más rígido, asemejándose al PP. Vale la pena señalar que, para películas con adición de MC-Est mayores a 0.5%, se pueden aumentar tanto la deformación a la ruptura como el módulo elástico, disminuyendo el tamaño de partícula y las aglomeraciones, factores que son responsables de la formación de puntos de ruptura, los cuales disminuyen la deformación de rotura. Esta observación se corrobora con las microscopías (Figura 33), en las cuales proporciones de MC-Est superiores al 0.5% presentan rasgaduras longitudinales causadas por la presencia de aglomeraciones de MC-

Est. Este fenómeno se origina porque las aglomeraciones de MC-Est son arrastradas durante el proceso de extrusión, generando fisuras que, en etapas posteriores, resultan en rupturas transversales.

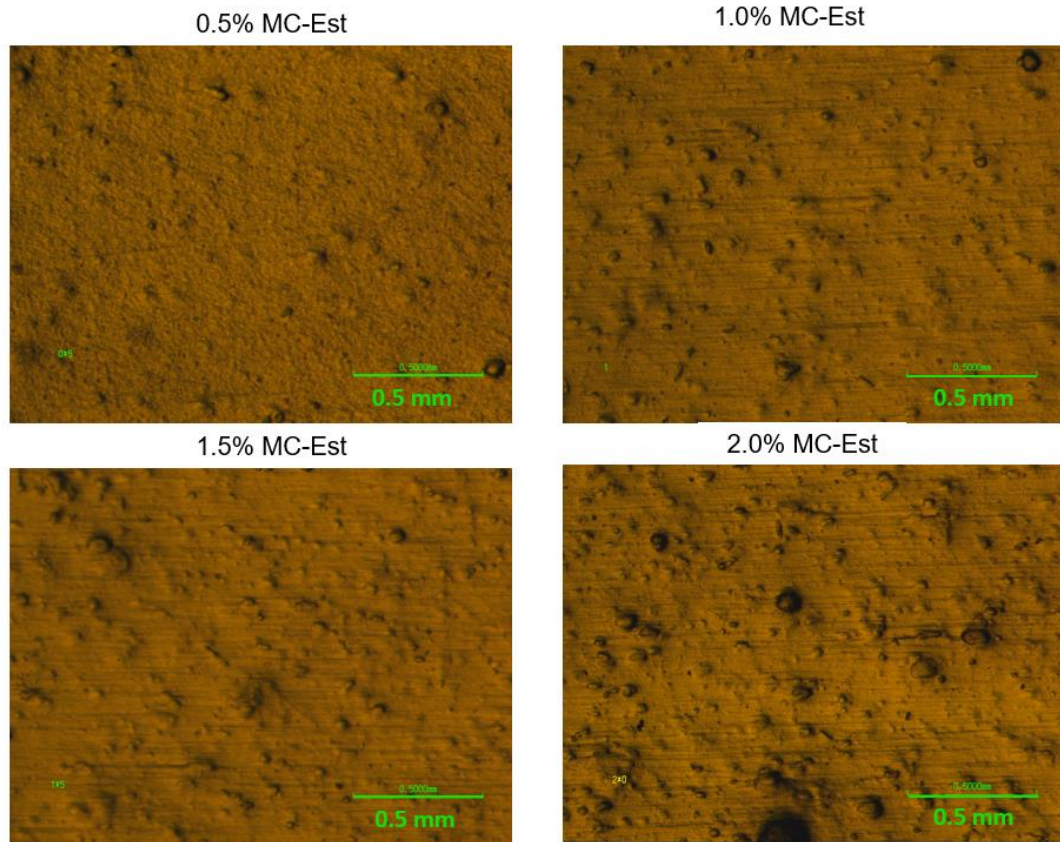


Figura 33. Estereoscopia de películas de PHBV/PLA 50/50 extruidas variando la cantidad de MC-Est.

Al analizar las propiedades mecánicas de las películas PHBV/PLA 50/50 con adición de MC-Est, se observó que las películas con una adición de 1.5% experimentaron un aumento en el esfuerzo máximo y el módulo elástico, resultando en una mayor rigidez del material, con lo cual se podría llegar a remplazar empaques de PP. En contraste, la incorporación del 0.5% condujo a una drástica disminución de estos valores y favoreció un incremento en la deformación a la rotura, otorgando mayor flexibilidad al material. También es importante resaltar que, el aumento de carga de MC-Est en la película genera aglomeraciones que producen fisuras, estas se pueden atribuir a un deficiente mezclado antes y durante la extrusión, llevando a una baja homogeneidad del aditivo en la película. Por lo cual, se sugiere explorar la reducción del tamaño de partícula para disminuir los

puntos de ruptura en el material, abriendo así la posibilidad de estudiar el comportamiento del material con cargas más elevadas de MC-Est.

Propiedades de barrera

La curva de absorción al agua (Figura 34), revela el punto de saturación de la matriz polimérica después de 24 horas de estar la muestra sumergida en agua. Posterior a este punto, se observa un proceso de desorción del agua, alcanzando un equilibrio después de las 100 h. La prueba demuestra que las películas iniciaron con un porcentaje de absorción al agua entre 0.4% y 0.7 %, alcanzando valores finales inferiores a 0.5 %. La película PHBV/PLA/MC-Est 50/50/0.5 muestra el menor porcentaje de absorción, con un 160% menos absorción de agua que la película PHBV/PLA sola al final del tiempo de análisis. Por otro lado, valores superiores a 0.5% de MC-Est presenta aglomeraciones que producen irregularidades sobre la superficie que pueden almacenar agua.

Al contrastar los valores de absorción de agua obtenidos para las diferentes muestras con los reportados para el PP (0.03-0.50 %),^{110,111} (polímero que exhibe propiedades mecánicas similares), se observó que las muestras de PHBV/PLA/MC-Est presentan porcentaje similares. Por ende, cualquiera de las formulaciones podría considerarse para sustituir este polímero.

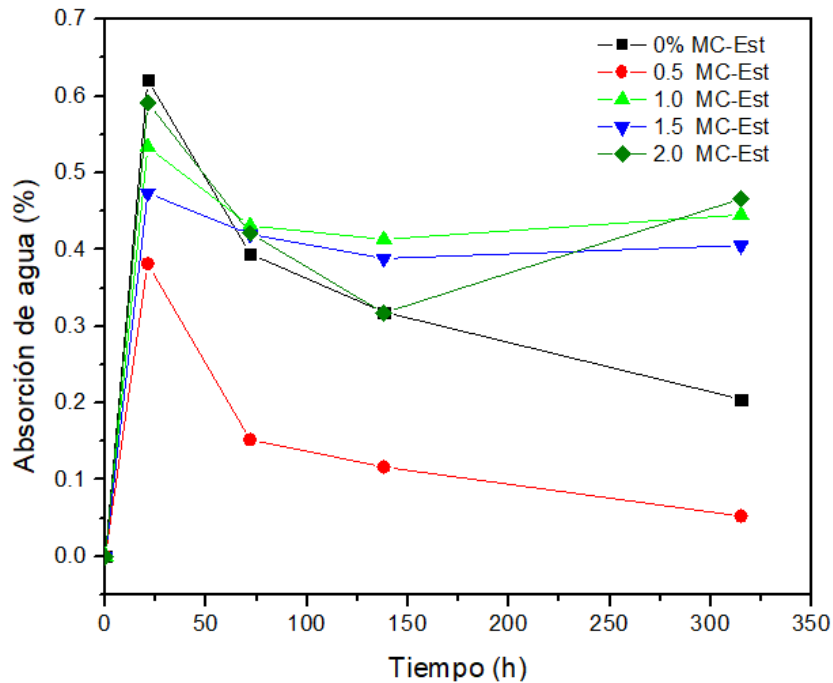


Figura 34. Curvas de absorción al agua de las muestras PHBV/PLA/MC-Est variando el porcentaje de MC-Est.

El análisis de la hidrofobicidad superficial por medio de ángulo de contacto dio como resultado los valores mostrados en la Figura 35. Con los cuales se determinó que las películas con MC-Est presentaron un ángulo de contacto mayor en comparación con las sin MC-Est, que exhibió un ángulo de 69.14° , indicando así que la adición de la MC-Est aumenta el ángulo de contacto. No obstante, no se observó una tendencia específica en relación con la proporción de la MC-Est, siendo la proporción de 1.0% la que registró el valor más elevado del ángulo de contacto, seguido por el de 2.0%. Este fenómeno sugiere que las películas no exhiben homogeneidad como se mencionó anteriormente, mostrando regiones con mayor ángulo de contacto en comparación con otras. Estas disparidades podrían deberse a la presencia de áreas más hidrofóbicas o a una mayor uniformidad superficial, ya que tanto la composición química como la homogeneidad en la superficie tienen el potencial de influir en la propiedad.

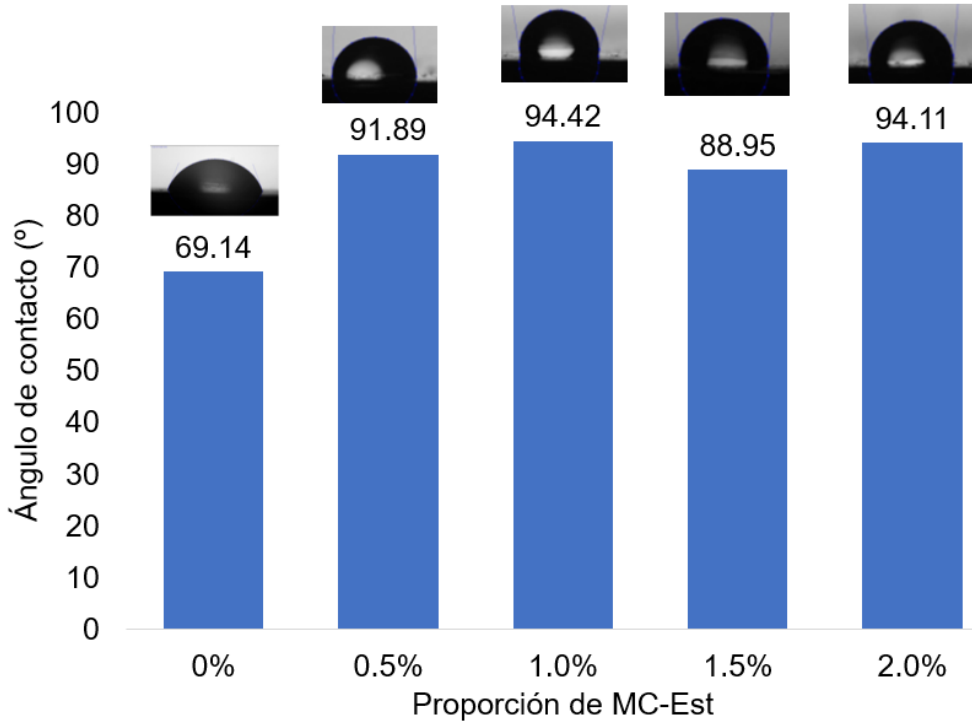


Figura 35. Ángulo de contacto de las películas PHBV/PLA/MC-Est variando la proporción de MC-Est.

Permeabilidad al vapor de agua

En el análisis de permeabilidad al vapor de agua, se consideraron películas PHBV Y PHBV/PLA 50/50 con adiciones de MC-Est. Las películas de PHBV tuvieron una incorporación de 1% y 2% de MC-Est, estas proporciones fueron seleccionadas debido a que demostraron un ángulo de contacto más alto en pruebas previas. Inicialmente, al comparar las diferentes proporciones de MC-Est en las películas de PHBV y PHBV/PLA, se evidenció una reducción en la velocidad de transmisión de vapor (WVTR) y del coeficiente de permeabilidad Q_{H_2O} . Es importante señalar que se notó un cambio más pronunciado en las películas compuestas únicamente por PHBV que en las mezclas de PHBV/PLA (Tabla 21). Donde la adición de 1% de MC-Est a la película de PHBV disminuyó el Q_{H_2O} en un 22%. Este fenómeno se atribuye al hecho de que la MC-Est, al estar presente en un material sin mezclas, exhibía una dispersión más pronunciada, generando un efecto más marcado sobre la película.

Comparando los datos obtenidos para las películas con los reportados para los polímeros comerciales, se observa que la permeabilidad de las películas obtenidas tanto de

PHBV/MC-Est como de PHBV/PLA/MC-Est es mayor que la de los polímeros convencionales como PP, PET y PE. Estos últimos, utilizados en envases de frutas y verduras, a menudo presentan problemas significativos debido a la condensación de agua, que aumenta la proliferación de patógenos. Esto indica que cualquiera de nuestras películas podría ser apta para reemplazar estos polímeros en el almacenamiento de productos con alta actividad de agua, generando resultados mejorados en términos de permeabilidad.

De la misma forma, al analizar los datos en función de los valores de permeabilidad al agua de películas de PA y PA* (bolsa comercial de PA aplicada a la exportación de gulupa marca Xtend), se observa que los valores de Q_{H_2O} presentados por películas 50/50 son muy cercanos. Donde las películas con 1.0% y 1.5% de MC-Est presentan un incremento del 3.8% en comparación con las de PA, mientras que las películas de solo PHBV con adición de 1% de MC-Est muestran un aumento del 8.6%. Cabe resaltar que en el caso de PHBV se presenta una menor dispersión de los datos en comparación con las películas de PHBV/PLA. Por lo tanto, se abre la posibilidad de utilizar estas películas como posible reemplazo.

Tabla 21. Permeabilidad al vapor de agua de películas de PHBV/PLA 50/50 y PHBV variando proporción de MC-Est.

Muestras		Espesor	WVTR	Q_{H_2O}
Matriz	% MC-Est	mm	$g\ m^{-2}\ d^{-1}$	$g\ mm\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}$
PHBV	0	0.0340 ± 0.001	46.66 ± 11.67	146.86 ± 45.15
PHBV	1.0	0.080 ± 0.002	12.02 ± 0.05	114.161 ± 1.42
PHBV	2.0	0.098 ± 0.001	16.90 ± 2.10	141.35 ± 22.74
PHBV/PLA	0	0.096 ± 0.001	10.79 ± 7.86	123.74 ± 99.43
PHBV/PLA	0.5	0.111 ± 0.004	10.75 ± 1.36	129.12 ± 17.21
PHBV/PLA	1.0	0.117 ± 0.009	9.02 ± 1.80	109.25 ± 14.79
PHBV/PLA	1.5	0.123 ± 0.011	8.55 ± 1.94	109.95 ± 27.131
PHBV/PLA	2.0	0.114 ± 0.009	8.52 ± 3.34	115.85 ± 52.07
PP ⁸⁸		0.025	8-14	20-36
PET ⁸⁸		0.025	5-10	13-26
PE ⁸⁸		0.025	14-20	36-52
PA ⁸⁸		0.025	40-150	104-392
PA*		0.023 ± 0.001	40.91 ± 1.11	105.55 ± 7.986

PA* se obtiene al realizar el análisis de permeabilidad a una bolsa comercial utilizada para el almacenamiento de gulupa.

Aunque se logró una mejora en la permeabilidad con la adición de MC-Est, es necesario aumentar la homogeneidad de la película debido a la notable variabilidad de los datos obtenidos. En el caso de las películas de PHBV/PLA 50/50, estas presentaron una mayor dispersión en los valores al aumentar la proporción de MC-Est, lo cual se atribuye a la formación de zonas de mayor homogeneidad de la mezcla PHBV, PLA y MC-Est, lo que permitió un coeficiente de permeabilidad menor, sin embargo, también se observa cómo se disminuye la variabilidad de la película 50/50 con la adición de MC-Est, con lo cual se puede afirmar que la MC-Est aumenta la compatibilidad entre el PHBV y el PLA. En el caso de las películas PHBV con adición de MC-Est, la mayor variación se observó para la adición de 2% de MC-Est. Este comportamiento, similar al de las películas 50/50, podría atribuirse a la dispersión de MC-Est en la matriz polimérica, generando zonas con un mayor contenido de partículas de MC-Est y, por ende, menor permeabilidad en esas áreas en comparación con las zonas con menor contenido de MC-Est.

Teniendo en cuenta el problema de homogeneidad se llevó a cabo la producción de películas de PHBV con un 2% de MC-Est molida y tamizada con el fin de observar si el tamaño de partícula afectaba la dispersión de la MC-Est y, por ende, su hidrofobicidad y permeabilidad. Cabe destacar que esta prueba se llevó a cabo exclusivamente para PHBV, ya que fue la película que mostró una mayor reducción en la permeabilidad con la adición de MC-Est. En esta prueba se compararon dos tipos de MC-Est: una previamente molida y tamizada antes de la reacción (MC-Est MT prev), y otra molida y tamizada después de la reacción (MC-Est MT). Se optó por la proporción más alta de MC-Est utilizada en los ensayos (2%) con PHBV para evaluar cualquier mejora en la dispersión de los datos y si al disminuir el tamaño de partícula esta igualaba o aumentaba la obtenida por la proporción de 1%. Además, considerando el comportamiento mecánico de las películas de PHBV con tendencia a empaques flexibles, se exploró el uso de glicerol (GLI) al 1% como aditivo para mejorar la dispersión de la MC-Est durante el proceso de extrusión. Los resultados de permeabilidad al vapor de agua e hidrofobicidad se presentan en la Tabla 22.

Tabla 22. Permeabilidad y ángulo de contacto de películas de PHBV con MC-Est tamizada y sin tamizar.

	Espesor	WVTR	Q_{H2O}	Angulo de Contacto
Muestras	mm	g m⁻² d⁻¹	g mm m⁻² atm⁻¹ d⁻¹	o
PHBV	0.0340 ± 0.001	46.66 ± 11.67	146.86 ± 45.15	105.182 ± 1.784
PHBV+2% MC-Est sin TM	0.098 ± 0.001	16.90 ± 2.10	141.35 ± 22.74	105.235 ± 1.256
PHBV+2% MC-Est TM prev	0.073 ± 0.001	17.64 ± 3.10	135.24 ± 23.81	104.126 ± 2.461
PHBV+2% MC-Est TM	0.066 ± 0.004	17.83 ± 1.70	124.03 ± 19.98	100.980 ± 0.346
PHBV+2% MC-Est TM prev +1% GLI	0.074 ± 0.001	22.98 ± 11.66	177.83 ± 95.69	99.880 ± 0.778
PHBV+2% MC-Est TM +1% GLI	0.053 ± 0.005	31.62 ± 2.61	175.83 ± 24.44	97.109 ± 1.233
PA*	0.023 ± 0.001	40.91 ± 1.11	105.55 ± 7.986	

PA* se obtiene al realizar el análisis de permeabilidad a una bolsa comercial utilizada para el almacenamiento de gulupa.

Considerando los resultados obtenidos, se observa que no hay una diferencia significativa en cuanto a la permeabilidad entre el uso de MC-Est molida y tamizada antes (MC-Est TM prev) o después de la reacción (MC-Est TM). A pesar de que los valores para MC-Est TM prev son ligeramente inferiores, existe una notable dispersión de los datos. Este fenómeno indica que, aunque las partículas de MC-Est estuvieran fracturadas y tuvieran puntos hidrofílicos expuestos, estos no perjudicaron la permeabilidad total de la película. Se observa un comportamiento similar al analizar el ángulo de contacto de la película. Contrario a lo sucedido al medir el ángulo de contacto de la MC-Est TM sola, el cual obtuvo valores de 0.

Por otra parte, se puede afirmar que en este caso el glicerol no contribuyó a la dispersión de la MC-Est dentro de la película; más bien generó aglomeración, como se aprecia en las estereoscopias de la Figura 36, donde se observan gránulos más grandes de MC-Est en las muestras con aditivo. En consecuencia, la permeabilidad de la película aumentó a valores mayores a la del PHBV sin aditivo. En estas microscopias se pudo observar gránulos más grandes en la MC-Est TM prev, lo cual se atribuye a que en esta se presenta un tamaño de partícula mayor al de la MC-Est TM.

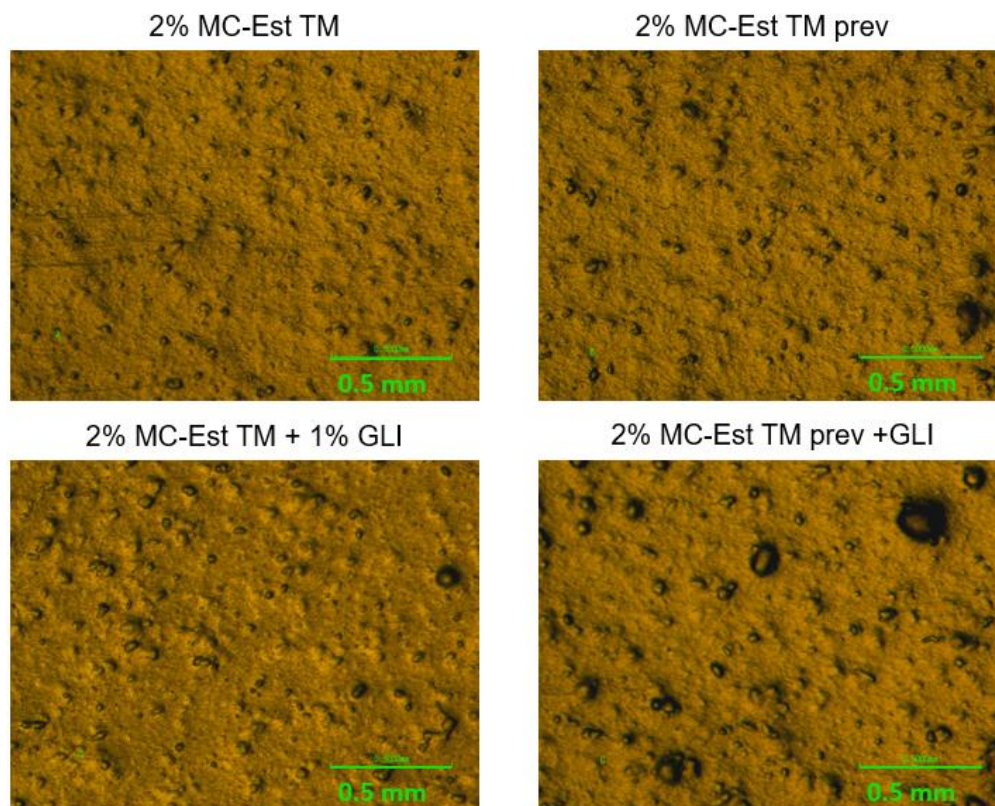


Figura 36. Estereoscopia de películas de PHBV/PLA/MC-Est 50/50/2% tamizada previamente o después de la funcionalización, con adición de glicerol (GLI) y sin adición de glicerol.

Análisis térmico

Las curvas termogravimétricas de las películas PHBV/PLA/MC-Est revelaron un aumento en la temperatura de la primera pérdida de peso, la cual se atribuye a una mejora en la estabilidad térmica de las cadenas de PHB de la molécula de PHBV por la presencia de MC-Est lo que resulta en un incremento en la estabilidad de la película (Figura37). Posteriormente, se observa una pérdida de masa más pronunciada a 356°C (segunda pérdida de masa, correspondiente al PLA) en proporciones de MC-Est mayores a 1%, seguida de una disminución de la caída en 403°C (tercera pérdida de masa, correspondiente a las cadenas de HV). Este patrón se apreció con mayor claridad en las curvas DTG, y sugiere que a una mayor concentración de MC-Est las cadenas de HV pierden estabilidad térmica. Cabe destacar que estos cambios no reflejan una diferencia significativa en la estabilidad de la película, lo que permite afirmar que la incorporación de

MC-Est en proporciones inferiores al 2% no altera la estabilidad del material. Este comportamiento es análogo al observado al introducir MC-Est en películas de PLA.³³

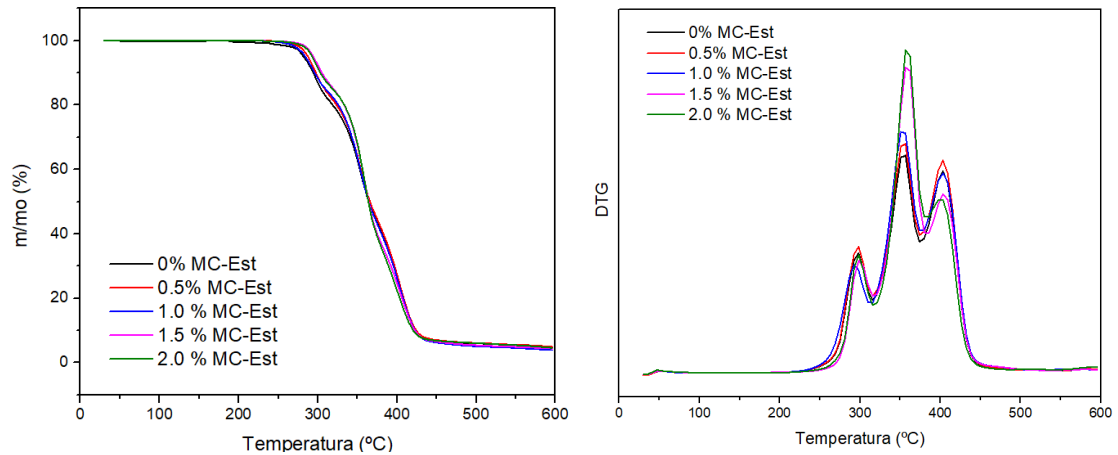


Figura 37. Curvas TG y DTG de películas PHBV/PLA/MC-Est con PHBV/PLA 50/50 variando proporción de MC-Est.

Por medio de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Figura 38), es posible analizar las variaciones en la cristalización y fusión del material al agregar MC-Est. Al calentar la muestra, se observaron las temperaturas de cristalización en frío (T_{cc}) y de fusión (T_m). La cristalización en frío o recristalización se manifiesta a través de un pico exotérmico, generado por la entalpía absorbida durante el crecimiento cristalino. Este fenómeno está relacionado con el enfriamiento rápido después de la fusión en la extrusora. En el caso de estas películas, este pico se presenta a 92°C , siendo una característica distintiva del PLA.⁵³ Aunque la cristalización puede experimentar variaciones en función del contenido de MC, no se observa una tendencia clara en el presente análisis, siendo la proporción del 1.5% la que muestra el mayor pico de cristalización en frío. Al considerar que la cristalización puede asociarse con la rigidez, se observa en este caso que a medida que aumenta el grado de cristalización, también lo hace la rigidez del material. La temperatura de fusión de las películas se mantiene en 153°C , sin presentar variaciones significativas con la adición de MC.

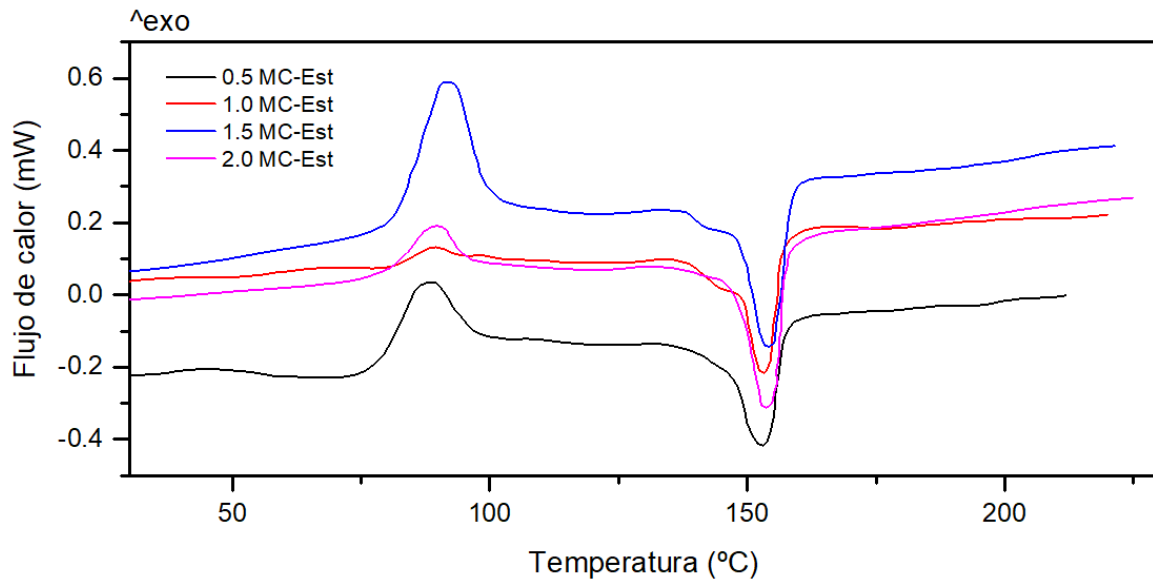


Figura 38. Calorimetría diferencial de barrido de películas de PHBV/PLA/MC-Est con PHBV/PLA 50/50 variando proporción de MC-Est

5.3 Conclusiones

Al incorporar MC-Est en la matriz polimérica, se observó una disminución del módulo elástico y esfuerzo de rotura con concentraciones de MC-Est de 0.5%. Sin embargo, también se encontró un aumento en la deformación a rotura, confiriéndole al material un comportamiento más flexible. Por el contrario, a concentraciones superiores (1% y 2%) se mantuvo el módulo elástico y esfuerzo de rotura, y a una concentración de 1.5%, estas propiedades aumentaron, generando un material más rígido, lo que podría considerarse como un posible sustituto del PP. Es relevante destacar que, para películas con concentraciones superiores al 0.5%, la deformación a la rotura disminuyó debido a fisuras provocadas por el arrastre de aglomeraciones durante el proceso de extrusión.

El coeficiente de permeabilidad de las películas PHBV/PLA 50/50 experimentó una disminución del 11.7% con proporciones de MC-Est del 1% y 1.5%, siendo estos los coeficientes de permeabilidad más bajos obtenidos. Por otra parte, en las películas de PHBV solo, la adición de 1% MC-Est tuvo un impacto más significativo, resultando en una disminución del 22% en el coeficiente de permeabilidad. Al comparar la permeabilidad de las películas PHBV/MC-Est y PHBV/PLA/MC-Est con la reportada para el PA, se observa que el PHBV con un 1% de MC-Est y el PHBV/PLA con adición del 1.0 y 1.5 de MC-Est

tiene coeficientes un 8.6% y 3.8% mayores que los de la PA. La diferencia es significativamente baja, lo que sugiere que las películas de PHBV/MC-Est y PHBV/PLA/MC-Est podrían considerarse como alternativas viables para reemplazar el PA.

De manera similar, se observó que el tamaño de partícula no tiene un impacto significativo en la permeabilidad y el ángulo de contacto a concentraciones del 2% de MC-Est. Además, se encontró que la incorporación de glicerol al 1% como agente compatibilizante entre el PHBV y la MC-Est no fue recomendable, ya que condujo a una disminución en la dispersión del material, generando aglomeraciones en el mismo.

6. Estudio exploratorio del aceite esencial de limoncillo como agente antimicrobiano para empaques de alimentos

*Considerando que las películas desarrolladas en los capítulos anteriores están destinadas al mercado de productos agrícolas, donde las considerables pérdidas se atribuyen a la corta vida útil de estos productos, este capítulo explora el uso de aditivos antimicrobianos de origen vegetal producidos en Colombia, con el objetivo de prolongar la vida útil de los productos frescos. En este contexto, se examina el potencial del aceite de limoncillo (LEO) como un aditivo activo contra *Botrytis cinerea*, uno de los patógenos que afecta significativamente el mercado mundial de frutas.*

Con este propósito, se procedió a la caracterización de dos tipos de aceite: uno obtenido mediante hidrodestilación de plantas cultivadas en la región y otro de origen comercial. Subsecuentemente, se llevaron a cabo comparaciones de sus efectos inhibitorios in vitro y se llevaron a cabo ensayos in vivo en almacenamiento de fresas con el objetivo de determinar la actividad del aceite esencial en los patógenos propios de las fresas comerciales, además de evaluar el impacto del LEO en la apariencia física de las mismas. En una etapa posterior, se llevó a cabo un caso de estudio para analizar el efecto de una película PHBV/PLA/MC-Est 50/50/1.5% en el sistema de prueba.

6.1 Introducción

Los empaques desempeñan un papel crucial en la industria de alimentos ya que garantizan la integridad e inocuidad de los productos. En este sentido, el uso de aditivos activos, con especial atención a los antimicrobianos, ha surgido como una estrategia clave para extender la vida útil de los alimentos y prevenir el crecimiento de microorganismos no deseados. Estos aditivos antimicrobianos se incorporan a los sistemas de envasado de alimentos como películas, recubrimientos y materiales de envasado.¹¹²

Siendo así, se han desarrollado diversos estudios acerca del efecto que tienen varios compuestos antimicrobianos sobre diferentes patógenos que se encuentran en los alimentos. En el caso de las frutas, uno de los hongos que más produce pérdidas en la postcosecha es la *Botrytis cinerea*, este es un patógeno fúngico notorio que provoca la descomposición grave de los frutos, afectando entre el 20 y 60% de la producción de uvas, fresas, tomates, moras, y frutas de pepa (manzanas, pera, duraznos y ciruela).¹¹³⁻¹¹⁶ produciendo pérdidas anuales de entre 10 y 100 billones de dólares.⁷⁷ Por lo anterior, se ha buscado compuestos amigables con el ambiente que puedan evitar su crecimiento y propagación, entre los compuestos más estudiados se encuentran los aceites esenciales. Entre estos, el aceite obtenido del limoncillo (*Cymbopogon citratus*) ha demostrado un gran efecto antimicrobiano contra el *Botrytis cinerea*, de ahí que se quiera estudiar su uso en envasado de frutas.^{75,79} Además, se ha investigado su uso en empaques biodegradables de PHB/PLA,⁴⁴ quitosano,^{81,84} y alcohol polivinílico.⁸² aplicados a la preservación de productos como fresa⁷⁸, una fruta de alta comercialización pero que tiene una actividad de agua alta y tiempos de vida útil de alrededor de 3-4 días en condiciones ambiente (20°C y humedad relativa de 40%- Bogotá).

En los aceites antimicrobianos, su composición varía por diversos factores como la región geográfica de la siembra, el clima, época del año, métodos y condiciones de extracciones.⁸⁰ De ahí que se quiera probar el uso de aceite de limoncillo extraído de plantas cultivadas en Colombia, por lo cual, en este trabajo se realizaron pruebas de inhibición *in vitro* contra *Botrytis cinerea* utilizando aceite esencial de limoncillo (LEO) extraído por hidrodestilación y con un aceite esencial comercial. Además, se exploró su efecto en el almacenamiento de fresas teniendo como recipiente un empaque comercial y,

posteriormente, en sistemas con matrices biodegradables. El objetivo principal es demostrar la viabilidad del LEO obtenido de plantas colombianas como un posible aditivo activo en empaques de bayas como la fresa, arándano, uchuva entre otras. Los cuales son de gran importancia comercial en el país.

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Obtención de extracto de limoncillo y caracterización.

La industria de los aceites ha experimentado un notable desarrollo a nivel mundial; no obstante, persisten desafíos, como los altos costos asociados y la falta de garantía en la pureza de los extractos. Por lo cual en este apartado se comparan dos tipos de aceite de limoncillo (LEO); uno obtenido por hidrodestilación (LEO-HD) y un aceite comercial (LEO-CO), esto con el fin de garantizar la pureza de los aceites. Cabe resaltar que no se utilizó ningún proceso de purificación para el aceite extraído por hidrodestilación. Al medir el índice de refracción y la densidad se encuentra que tienen valores similares en el índice de refracción (Tabla 23), lo que sugiere que tienen componentes similares, sin embargo, se aprecia una ligera diferencia en la densidad, sugiriendo posibles variaciones en su composición.

Tabla 23. Caracterización del aceite de limoncillo.

Muestra	Índice de refracción	Densidad
LEO-HD	1.48256 ± 0.0017	0.9523 ± 0.0027
LEO-CO	1.48476 ± 0.0032	0.9091 ± 0.0020

Teniendo en cuenta la diferencia en la densidad se llevó a cabo un análisis de espectroscopia infrarroja (FTIR) de los dos aceites, revelando señales características del citral (componente principal de este tipo de aceites), como se evidencia en la Figura 39.¹¹⁷ Sin embargo, se observa una diferencia relevante entre los dos aceites; el aceite comercial presenta una señal más pronunciada alrededor de 3500 cm⁻¹, característica de grupos OH. Esta señal puede atribuirse a una posible contaminación, como la presencia de agua, indicando que el aceite obtenido por hidrodestilación tiene mayor pureza que el comercial. En conjunto, el análisis indica que ambos aceites presentan un elevado contenido de citral, componente con mayor actividad antimicrobiana.

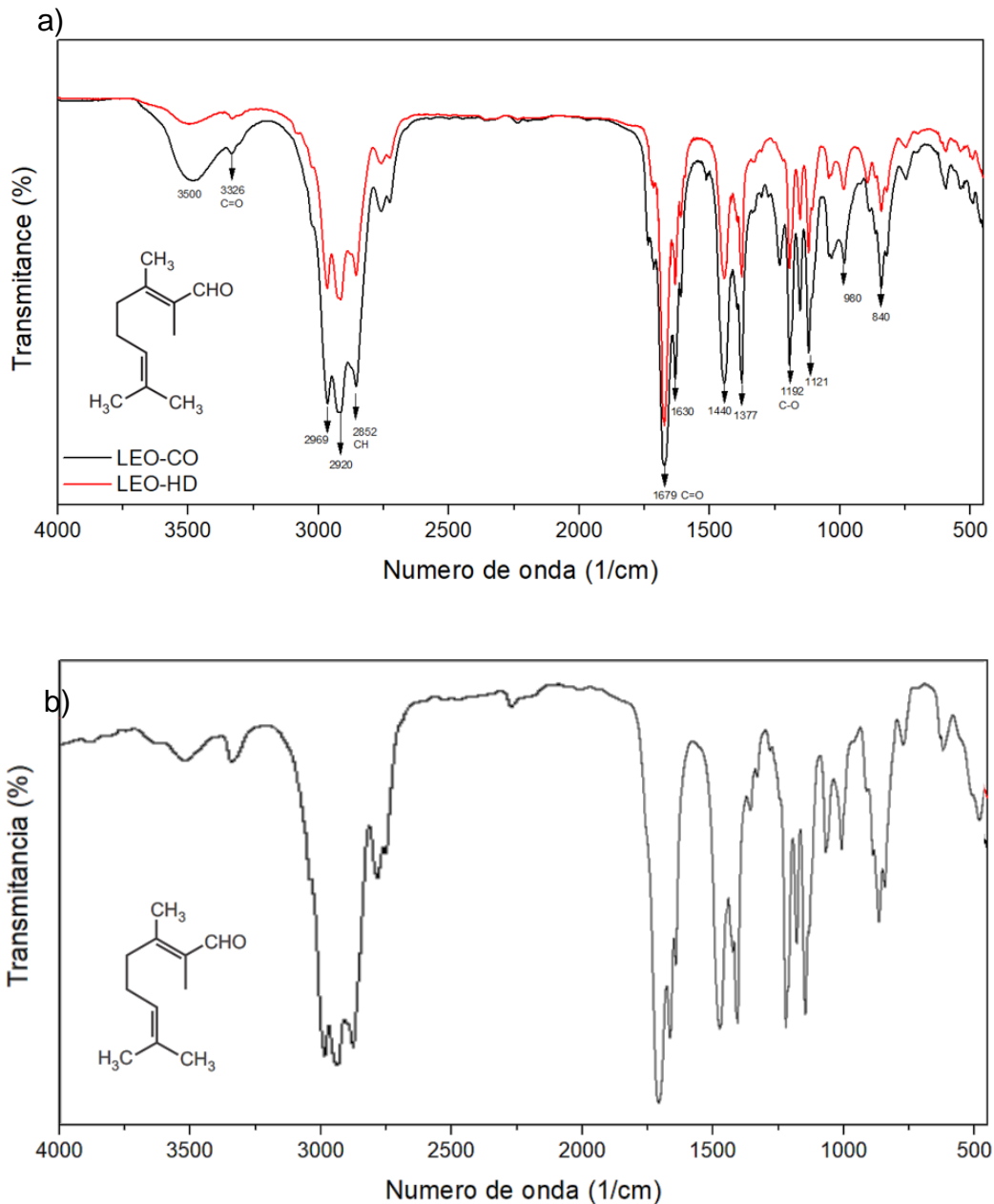











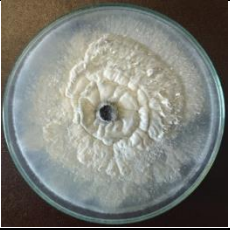


Figura 39. Espectroscopia infrarroja de a) aceite esencial de limoncillo (LEO) y b) citral.¹¹⁷

6.2.2 Efecto inhibitorio de *Botrytis cinerea* (ensayo *in vitro*)

En los ensayos *in vitro* se pudo demostrar que a concentraciones de 125 $\mu\text{L/L}$ tanto los volátiles del LEO-HD como del LEO-CO tienen una alta actividad antimicrobiana contra *Botrytis cinerea* LPNV8 (Tabla 24). Este hecho es de gran importancia ya que indica que no se requiere de un contacto directo entre el patógeno y el aceite, para que este último

eviten el crecimiento y la proliferación del hongo. El efecto antimicrobiano se puede atribuir al alto contenido de citral de estos aceites, ya que como se pudo observar el análisis FTIR es el componente principal. Por otra parte, al comparar los dos aceites no se observó ninguna diferencia en su actividad, por lo cual se puede confirmar que el aceite extraído de plantas de limoncillo producidas en Colombia, pueden utilizarse como agente antimicrobiano ante *Botrytis cinerea*.

Tabla 24. Efecto inhibitorio de volátiles de aceite de limoncillo extraído por hidrodestilación (LEO-HD) y comercial (LEO-CO) en concentraciones 125 µL/L contra *Botritis Cinerea*.

	Control	LEO-HD	LEO-CO
3er día			
5to día			
7mo día			
10mo día			
Inhibición relativa %		100%	100%

6.2.3 Prueba *in vivo* de efectos inhibidores

Considerando los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*, se optó por utilizar exclusivamente el LEO-HD en los ensayos *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, el

objetivo es fomentar el uso de LEO procedente de plantas colombianas como aditivo antimicrobiano. Teniendo en cuenta lo anterior, se evaluaron cinco concentraciones de LEO-HD (25, 50, 75, 100 y 200 $\mu\text{L/L}$) con el fin de observar el efecto del LEO en fresas almacenadas. Las fresas con el LEO se dispusieron en empaques de PET comercial, como se muestra en la Figura 40. Cabe resaltar que para este ensayo no se contaminó a la fruta con la cepa de hongo de *Botrytis cinerea*, ya que se buscaba observar el efecto del aceite sobre los patógenos inherentes a las fresas comerciales. Además, el LEO no estuvo en contacto con la fruta, si no que se impregno en un trozo de papel filtro a un lado del empaque, para que este se volatilizara por todo el empaque. El seguimiento de las fresas se llevó a cabo durante 5 días, evaluando tanto los cambios físicos como las variaciones de peso.



Figura 40. Montaje ensayo prueba *in vivo* de efecto inhibitorio de LEO-HD en fresas.

Los resultados del ensayo se encuentran en la Tabla 25, calificando el crecimiento del hongo. Los resultados muestran que el daño por *Botrytis cinerea* en fresa se presenta al tercer día de almacenamiento. Al comparar el control con las muestras que contienen LEO-HD, se pudo observar que al quinto día existe una inhibición del 85% del hongo. Cabe resaltar que este experimento se llevó a cabo a condiciones ambientales de la ciudad de Bogotá (22°C y 45 % de humedad) por lo cual hubo un aumento en la velocidad de respiración y transpiración de la fruta.

Es importante destacar que, aunque a concentraciones mayores de 100 $\mu\text{L/L}$ de LEO no se obtuvo crecimiento de patógeno sobre la superficie de las fresas, estas si presentaron

un descenso en la calidad de la fruta, como variación en el color y olor. Además, se encontró que el empaque comercial que se utilizó presentaba una baja permeabilidad al vapor de agua, generando condensación sobre la superficie. En el Anexo B se encuentra el seguimiento fotográfico de las muestras evaluadas. Este hallazgo respalda la relevancia de introducir nuevos tipos de materiales en el mercado, como las películas de PHBV/PLA/MC-Est detalladas en el capítulo 6. Estas películas demostraron contar con una permeabilidad al vapor de agua adecuada para el almacenamiento de productos con altos valores de actividad de agua, como las frutas.

Tabla 25. Resultados de ensayos *in vivo* de fresas con LEO-HD.

Concentración LEO-HD	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Control	0%	0%	3%	27%	77%
25 µL/L	0%	0%	5%	43%	53%
50 µL/L	0%	0%	0%	17%	13%
75 µL/L	0%	0%	0%	0%	0%
100 µL/L	0%	0%	0%	7%	10%
200 µL/L	0%	0%	0%	0%	0%

El estado de aceptabilidad de la fruta es uno de los aspectos más importantes al momento de comercializar un producto. Por lo tanto, aunque se asegura la seguridad alimenticia por la ausencia de patógenos, si la fruta se ve afectada en gran proporción por el aditivo, haciendo que sus propiedades organolépticas cambien o generen un mal estado, este no es viable. Por lo cual, en la Tabla 26, se evaluó el aspecto físico de la fruta con el pasar de los días.

En esta evaluación, se encontró que a altas concentraciones de aceite esencial se produjo un pardeamiento en la fresa, como se observa en la Figura 41, donde se compararon los 5 tratamientos con el control. Se observó que la fresa del control, aunque está infectada de *Botrytis cinerea* aún conserva un color brillante, por el contrario, la muestra con una concentración de 200 µL/L, aunque no presentó ninguna infección del hongo mostró un aspecto no saludable de la fruta y presento daños por agua. Esto sugirió una afectación en los procesos metabólicos de la fruta o una aceleración en los procesos de transpiración y respiración por la adición del aceite. Por otra parte, bajas dosis del aceite hicieron que el

patógeno pudiera crecer. En consecuencia, se pudo observar que las muestras de 200 $\mu\text{L/L}$, 50 $\mu\text{L/L}$, 25 $\mu\text{L/L}$ y control, mostrados en la Figura 41, son inaceptables en la industria.



Figura 41. Aspecto físico de las muestras en el quinto día de la prueba.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, se observó que las frutas fueron aceptables para todas las concentraciones hasta el día 2. Posterior a este día, las concentraciones mayores de 200 $\mu\text{L/L}$ no fueron aceptables, para esta misma concentración la fruta fue inaceptable posterior al 5 día, significa que las concentraciones más adecuadas para este tipo de envases son de 50 a 100 $\mu\text{L/L}$.

Tabla 26. Aceptabilidad de la fresa variando la proporción de LEO-HD a 5 días de almacenamiento.

Muestra	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Control	5	4.33	2.67	0	0
25 $\mu\text{L/L}$	5	5	2.67	0	0
50 $\mu\text{L/L}$	5	5	4	1	0
75 $\mu\text{L/L}$	5	5	4	3.33	3
100 $\mu\text{L/L}$	5	5	4	3.33	2
200 $\mu\text{L/L}$	5	5	4	2	1

Adicionalmente, al hacer el seguimiento a la masa del sistema se observó una menor pérdida de peso en los controles (Figura 42). Para las diferentes muestras con LEO-HD, se observa un decrecimiento en la pérdida de agua con el aumento del contenido de aceite. Al comparar el control con la muestra de 200 $\mu\text{L/L}$ de LEO-HD, el control sobrepasó la muestra en un 46% después de las 90 h. Este efecto se pudo dar por la condensación del agua dentro del empaque. En el análisis físico de las muestras, se encontró como había un mayor daño por retención de agua en muestras con las proporciones de LEO-HD superiores, lo que indicó que el aceite aumentaba los procesos metabólicos de la fresa generando más agua que se condensa sobre la superficie del empaque, este condensado al estar en estado líquido no permeó el material. Otro aspecto para tener en cuenta es el consumo de agua del hongo, ya que al estar en una etapa de crecimiento consume agua disminuyendo el vapor del sistema.

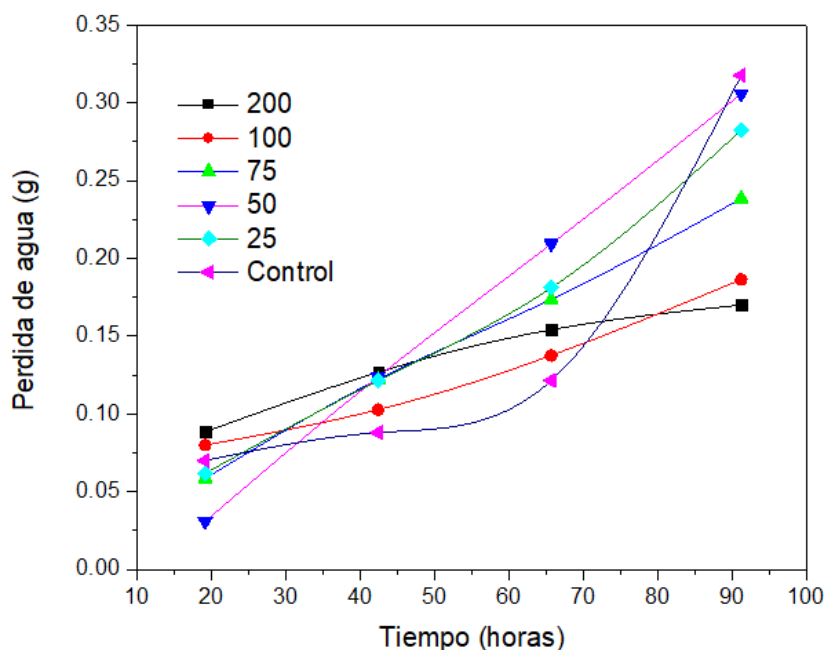


Figura 42. Pérdida de peso de los empaques con LEO-HD en pruebas *in vivo* en el almacenamiento de fresas.

6.2.4 Caso de estudio - Almacenamiento de fresas incluyendo en el empaque una lámina de PHBV/PLA/MC-Est

Dado los resultados previos y considerando que la condensación de agua es un factor crucial en el deterioro de las fresas, se examinó el desempeño del sistema al modificar una parte del envase. Esto se logró al agregar una película de PHBV/PLA/MC-Est 50/50/1.5 en la parte superior del envase, como se muestra en la Figura 43. El objetivo era incrementar la permeabilidad del envase y así reducir la acumulación de agua condensada en su interior. En este caso, se aplicó LEO-HD a una concentración de 100 $\mu\text{L/L}$ y se comparó con un control, que tenía la lámina añadida, pero sin el aceite. Los resultados de estos ensayos fueron contrastados con los obtenidos en el experimento anterior con envases compuestos solo por PET.



Figura 43. Montaje ensayo prueba *in vivo* de efecto inhibitorio de LEO-HD en fresas con adición de película de PHBV/PLA/MC-Est.

Se llevó a cabo el monitoreo del desarrollo del hongo, y al reemplazar parte del envase con una lámina de PHBV/PLA/MC-Est (Tabla 27), se observó una disminución en la aparición del hongo en un día en comparación con las muestras donde no se utilizó la lámina. No obstante, al quinto día se evidenció crecimiento del hongo, siendo la muestra de control la que experimentó una mayor proliferación, resultando en una contaminación del 60% de los frutos.

Tabla 27. Resultados de crecimiento de *Botrytis cinerea* en almacenamiento de fresas con LEO-HD y película de PHBV/PLA/MC-Est 50/50/1.5 en la parte superior del empaque.

Muestra	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Control	0%	0%	3%	27%	77%
100 μ L/L	0%	0%	0%	7%	10%
Control Lamina	0%	0%	0%	0%	60%
100 μ L/L Lamina	0%	0%	0%	0%	10%

Al comparar los resultados, se evidenció que las fresas que contaban con la lámina extendieron su período de aceptabilidad de 2 días a 3 días en el caso de los controles y de 3 días a 4 días cuando se aplicó LEO (Tabla 28). La incorporación de la lámina resultó

en una mejora en comparación con el control, especialmente al incluir el aceite esencial de limoncillo (LEO), como se puede apreciar en la Figura 44. Donde, se observa la presencia del patógeno *Botrytis cinerea* y la degradación de la fruta en el control, mientras que la fresa tratada exhibió buenas características de color y olor.

Tabla 28. Aceptabilidad de la fresa variando la proporción de LEO-HD y adición de lámina de PHBV/PLA/MC-Est al empaque a 5 días de almacenamiento.

Muestra	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Control	5	4.33	2.67	0	0
100 μ L/L	5	5	4	3.33	2
Control Lamina	5	5	4	3	0
100 μ L/L Lamina	5	5	5	4	3

Así mismo, se nota que la incorporación de la película provoca un aumento en la pérdida de peso de las muestras, llegando a alcanzar hasta 0.43 g en el caso del control, lo que representa un 63% más en comparación con la prueba sin la película de PHBV/PLA/MC. Además, en este ensayo se aprecia cómo la pérdida de peso experimenta un aumento lineal al implementar el aceite esencial de limoncillo (LEO) en el envase. Es importante destacar que en el último día, el control exhibió un aumento en la pérdida de peso, al igual que un incremento en el crecimiento del hongo. Por lo tanto, sería pertinente llevar a cabo más ensayos para determinar si este efecto guarda alguna relación.

a)



b)

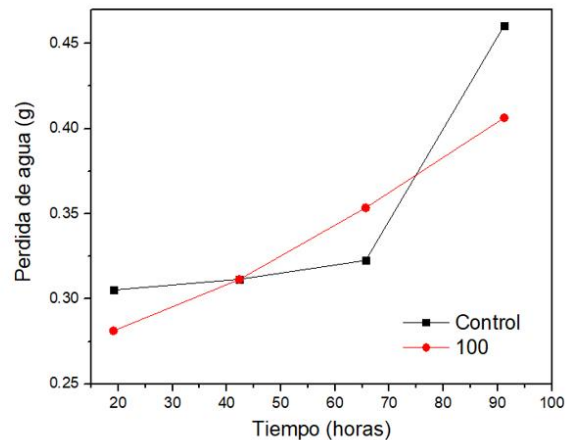


Figura 44. a) Aspecto físico de las muestras en el quinto día de la prueba, b) Pérdida de peso de los empaques con 100 $\mu\text{L/L}$ de LEO-HD en pruebas *in vivo* de fresas con película de PHBV/PLA/MC-Est.

Teniendo en cuenta estos datos, se puede concluir que un empaque producido a partir de PHBV/PLA/MC-Est genera mayor permeabilidad de vapor de agua que los empaques comerciales de PET, lo cual conlleva a una disminución en la cantidad de agua condensada dentro del empaque.

6.3 Conclusiones

Al momento de utilizar algún aceite esencial, se requiere revisar atentamente los compuestos deseados y su pureza. En este caso, al comparar el aceite esencial de limoncillo extraído por hidrodestilación y el comercial, se encontró que tenían altos contenidos de citral, sin embargo, al analizar el espectro infrarrojo se encontraron diferencias en señales que podrían significar contaminantes que pueden afectar los análisis.

Los ensayos *in-vitro* reflejaron que tanto LEO-HD como LEO-CO, tuvieron actividad antifúngica contra el patógeno de *Botrytis cinerea* a concentraciones de 125 $\mu\text{L/L}$, lo cual se pudo atribuir a que estos aceites tienen una alta concentración de citral dentro de su composición. Es importante resaltar los resultados obtenidos por la muestra de LEO-HD ya que indica que este aceite, el cual fue extraído de plantas colombianas puede servir como aditivo antimicrobiano contra *Botrytis cinerea*.

Los ensayos *in-vivo* en fresas arrojaron que las proporciones de 75 y 100 $\mu\text{L/L}$ de LEO-HD generaron actividad antimicrobiana contra *Botrytis cinerea* en fresas comerciales. A proporciones más bajas de este aceite, se producía crecimiento del patógeno, y a mayores proporciones, se produjo un daño en las características organolépticas de la fruta, afectando la aceptabilidad del producto.

También se encontró que a mayores proporciones del aceite esencial se producía una menor pérdida de masa total. Este hecho, aunque es beneficioso para las empresas comercializadoras de productos frescos ya que disminuye la pérdida de producto por deshidratación, en este caso es contraproducente, ya que la baja permeabilidad en un producto como la fresa, que tiene alta actividad de agua de 99.7% y puede producir ablandamiento, producto del contacto con agua condensada dentro del empaque, como

se pudo observar en los bajos valores de aceptabilidad para los empaques con las mayores proporciones de aceite.

Además, se puede afirmar que el uso de empaques de PHBV/PLA/MC-Est disminuye la cantidad de agua condensada dentro del empaque al aumentar la permeabilidad de vapor de agua. Lo cual indica que se puede utilizar para producir empaques destinados al almacenamiento de fruta con alta actividad de agua.

7. Conclusiones generales y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Dada la importancia de la agroindustria para nuestro país y las regulaciones en contra de los materiales no biodegradables, se hace necesario contar con materiales biodegradables que presenten propiedades mecánicas, físicas y de barrera al menos tan efectivas como las de sus contrapartes no biodegradables. En este contexto, la investigación de mezclas de polímeros biodegradables, tales como el poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV), políácido láctico (PLA) y microcelulosa acetilada (MC-Est), se vuelve fundamental.

En esta investigación, se exploraron las mezclas de PHBV/PLA, revelando que el incremento en la proporción de PLA conduce a un comportamiento más rígido, mientras que su reducción resulta en un material más flexible. Además, se observó que el aumento de PLA en la mezcla disminuye la hidrofobicidad del material. En consecuencia, las proporciones de PHBV/PLA 50/50 exhiben características adecuadas para aplicaciones que requieren rigidez, siendo una opción potencial para sustituir al PP o PET. Por otro lado, las películas compuestas solo por PHBV, al ser más flexibles, podrían ser alternativas para reemplazar envases de PE-LD y PA. Lo cual se confirma al no observarse cambios en el perfil sensorial del chocolate al 85% y 90% al ser almacenado en empaques de PHBV.

Al considerar aditivos para el PHBV y PLA que puedan mejorar tanto las propiedades mecánicas como las de barrera, la microcelulosa (MC) se resalta como una opción destacada. En este contexto, para aumentar su compatibilidad con los polímeros y conferirle propiedades hidrofóbicas, la modificación mediante acetilación se presenta como el método más efectivo. Teniendo en cuenta lo anterior, se obtuvo que esta reacción proporciona resultados óptimos en términos de hidrofobicidad cuando se lleva a cabo a 100°C durante 8 horas, utilizando anhídrido acético (AA) como agente acetilante en proporciones de 0.5 p/v de MC/AA, y ácido cítrico como catalizador. El producto resultante,

MC-Est, exhibe un ángulo de contacto de 153°, por lo cual se considera un material hidrofóbico.

Al explorar el uso de MC-Est como aditivo en películas de PHBV/PLA 50/50 y PHBV, se observa una disminución en la flexibilidad de las películas de PHBV/PLA con concentraciones de 0.5% de MC-Est y un aumento en la rigidez con adiciones de 1.5% de MC-Est. Además, se registra un incremento del 22% en la permeabilidad al vapor de agua al introducir un 1% de MC en películas de PHBV. Estos resultados llevan a obtener valores cercanos a los de los envases comerciales de PA utilizados en la exportación de gulupa.

Finalmente, al considerar aditivos naturales que aporten un valor agregado a los envases biodegradables, se exploró la utilización de aceite esencial de limoncito (*Cymbopogon citratus*), extraído mediante hidrodestilación, utilizando plantas cosechadas en Colombia, como un posible aditivo antimicrobiano contra el hongo *Botrytis cinerea*. Los ensayos *in vitro* revelaron que concentraciones de 125 µL/L lograron una inhibición del 100%, mientras que en los ensayos *in vivo* se obtuvo una inhibición completa a concentraciones superiores a 70 µL/L. Sin embargo, concentraciones mayores a 100 µL/L afectaron el color y el olor de la fruta, lo cual era inesperado teniendo en cuenta la literatura científica consultada. Finalmente, la incorporación de una película de PHBV/PLA/MC-Est 50/50/1.5 en un envase comercial de PET durante el almacenamiento de fresas aumentó la permeabilidad al vapor de agua y redujo la condensación de agua dentro del envase.

7.2 Recomendaciones

Se recomienda ampliar el estudio de la incorporación de la MC-Est molida y tamizada a los empaques poliméricos de PHBV/PLA, mejorando el proceso mediante la peletización de esta, lo cual se cree generara un aumento en la dispersión y distribución del material.

Se sugiere llevar a cabo ensayos *in vivo* utilizando las formulaciones PHBV/MC-Est (100/1) o PHBV/PLA/0.5 (50/50/0.5) para el envasado de gulupa. Asimismo, se recomienda aplicar el termoformado a las películas PHBV/PLA/MC 50/50/1.5 para la fabricación de envases rígidos destinados al embalaje de bayas como fresas, arándanos y uchuvas.

Se sugiere ampliar los ensayos de actividad antimicrobiana, explorando pruebas a temperaturas más bajas y utilizando medios encapsulantes. Además, se recomienda llevar a cabo pruebas adicionales en otras frutas, como arándanos y uchuvas, para evaluar la eficacia del agente antimicrobiano en diferentes contextos y aplicaciones.

A. Anexo: Encuesta realizada en los paneles sensoriales de chocolate

Las encuestas se realizaron por medio de formularios de Google, los cuales contenían las siguientes preguntas.

Nombre: _____

Muestra: A _____ B _____

Evalúe las siguientes características sin consumir la muestra.

Evalúe el color de la muestra. Donde 1 es un color diferente a café y 5 es su color característico.

1 2 3 4 5

Evalúe homogeneidad del color de la muestra. Donde 1 es no homogéneo y 5 es totalmente homogéneo.

1 2 3 4 5

Evalúe la textura de la muestra. Donde 1 es granulado-áspero y 5 es suave.

1 2 3 4 5

Evalúe el aroma de la muestra. Donde 1 es evidencia de olores no característicos del chocolate o aroma a chocolate fermentado y 5 es fuerte olor a chocolate.

1 2 3 4 5

Evalúe el crujido al partir la muestra de chocolate. Donde 1 es no presenta sonido y 5 es un sonido fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe la firmeza de la muestra de chocolate. Donde 5 es un sonido fuerte y 1 es no presenta.

1 2 3 4 5

Evalúe la adherencia al tacto de la muestra de chocolate. Donde 5 es un sonido fuerte y 1 es no presenta.

1 2 3 4 5

Consuma una porción de la muestra y evalúe las siguientes características:

Evalúe el sabor amargo. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe el sabor ácido. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe la astringencia de la muestra (Sensación de resequedad que causa en la boca el mamoncillo o la curuba). Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe el sabor a cacao de la muestra. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe el dulce de la muestra. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra presenta sabor a nueces. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra presenta sabor afrutado. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si tiene sabor a frutos secos la muestra. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra tiene sabor floral con perfume de flores (rosa, violeta). Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra presenta sabor especiado (regaliz, canela, pimienta, clavo de olor, nuez moscada). Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra presenta retrogusto (presencia de diferentes características después de la muestra es tragada). Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Tomé otro bocado de la muestra y evalúe si encuentra alguno de estos defectos.

Evalúe si la muestra presenta humedad. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra sabor rancio. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra sabor a tierra. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5

Evalúe si la muestra sabor u olor a químicos. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.

1 2 3 4 5









Evalúe si la muestra sabor u olor a humo. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.













1 2 3 4 5










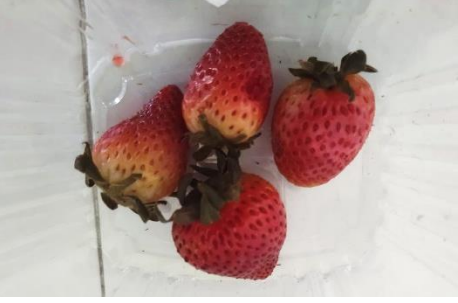
Evalúe si la muestra sabor agrio. Donde 1-No presente, 2-Debil, 3-Moderado, 4-Fuerte, 5-Muy fuerte.







1 2 3 4 5

B. Anexo: Pruebas inhibitorias *in vivo*

Muestra	Dia 1	Dia 5
Control 1		
Control 2		
Control 3		
25 μ L/L 1		

<p>25 μL/L 2</p>		
<p>25 μL/L 3</p>		
<p>50 μL/L 1</p>		
<p>50 μL/L 2</p>		
<p>50 μL/L 3</p>		
<p>75 μL/L 1</p>		

75 μ L/L 2		
75 μ L/L 3		
100 μ L/L 1		
100 μ L/L 2		
100 μ L/L 3		

<p>200 μL/L 1</p>		
<p>200 μL/L 2</p>		
<p>200 μL/L 3</p>		

Bibliografía

1. Europe P. Plastics – the Facts 2022. *Plast Eur.* 2022;(October):1-81. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>
2. Plastics Europe. Plastics the fact 2021. *Plast Eur Mark Res Gr Conversio Mark Strateg GmbH.* Published online 2021:1-34. <https://plasticseurope.org/>
3. Singh J, Singh SP. Damage Reduction to Food Products During Transportation and Handling. In: *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering.* Elsevier; 2019:741-770. doi:10.1016/B978-0-12-814803-7.00028-2
4. Han J, Ruiz-Garcia L, Qian J, Yang X. Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018;17(4):860-877. doi:10.1111/1541-4337.12343
5. MADs. *Plan Nacional Para La Gestión Sostenible de Los Plásticos de Un Solo Uso.*; 2021. <http://hdl.handle.net/10654/44240>
6. Munevar T. Cómo avanza la exportación de frutas exóticas desde Colombia al continente europeo. infobae. Published 2023. <https://www.infobae.com/colombia/2023/08/21/como-avanza-la-exportacion-de-frutas-exoticas-desde-colombia-al-continente-europeo/#:~:text=Este proceso puede realizarse por,otras dos semanas más frescas.>
7. Colombia exportó US\$74,3 millones de frutas exóticas en 2019, 6% más que el registro de 2018. Accessed June 6, 2021. <https://www.agronegocios.co/agricultura/colombia-exporto-us743-millones-de-frutas-exoticas-en-2019-6-mas-que-en-2018-2950228>
8. Ue D, Parlamento DEL, Del EY. 14.6.2018. 2018;2018:141-154.
9. Buricatá A. El mundo reclama más frutas exóticas colombianas. El mundo reclama más frutas exóticas colombianas. Published 2021. Accessed

- January 13, 2022. <https://blog.croper.com/el-mundo-reclama-mas-frutas-exoticas-colombianas/>
10. Westlie AH, Quinn EC, Parker CR, Chen EYX. Synthetic biodegradable polyhydroxyalkanoates (PHAs): Recent advances and future challenges. *Prog Polym Sci.* 2022;134:101608. doi:10.1016/j.progpolymsci.2022.101608
 11. Semeniuk I, Kochubei V, Karpenko E, Melnyk Y, Skorokhoda V, Semenyuk N. Thermal and physico-mechanical properties of biodegradable materials based on polyhydroxyalkanoates. *Polimery/Polymers.* 2022;67(11-12):561-566. doi:10.14314/polimery.2022.11.3
 12. Chico M, Sampedro T. Producción de bioplásticos y sus aplicaciones como empaque de alimentos: PLA Y PHB. *Rev Aliment Cienc e Ing.* 2022;29:31-56.
<https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/aci/article/download/1858/2271/5416>
 13. A. Adorna J, Ruby RL, Dang VD, Doong RA, S. Ventura JR. Biodegradable polyhydroxybutyrate/cellulose/calcium carbonate bioplastic composites prepared by heat-assisted solution casting method. *J Appl Polym Sci.* 2021;(August):1-14. doi:10.1002/app.51645
 14. Critelli P, Pesante G, Lupinelli S, et al. Production and characterisation of PHAs by pure culture using protein hydrolysates as sole carbon source. *Environ Technol Innov.* 2022;28:102919. doi:10.1016/j.eti.2022.102919
 15. Hankovits MI. Estudio del efecto de un plastificante polimérico en las propiedades de películas biodegradables con potencial uso en envases. *Univ Nac Mar del Plata.* Published online 2019.
 16. Seoane IT, Cerrutti P, Vazquez A, Manfredi LB, Cyras VP. Polyhydroxybutyrate-Based Nanocomposites with Cellulose Nanocrystals and Bacterial Cellulose. *J Polym Environ.* 2017;25(3):586-598. doi:10.1007/s10924-016-0838-8
 17. Ariagna L., Rivera Brisol, Ángel Serrano Aroca. Métodos de refuerzo mecánico del poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) para aplicaciones industriales avanzadas. *Nereis Rev Iberoam Interdiscip métodos Model y*

- simulación*. 2018;10(August):79-94.
18. Ilyas RA, Sapuan SM, Kadier A, et al. Properties and Characterization of PLA, PHA, and Other Types of Biopolymer Composites. In: *Advanced Processing, Properties, and Applications of Starch and Other Bio-Based Polymers*. Elsevier; 2020:111-138. doi:10.1016/B978-0-12-819661-8.00008-1
 19. Xu H, Zhou J, Odelius K, Guo Z, Guan X, Hakkarainen M. Nanostructured Phase Morphology of a Biobased Copolymer for Tough and UV-Resistant Polylactide. *ACS Appl Polym Mater*. 2021;3(4):1973-1982. doi:10.1021/acspm.1c00057
 20. Ye G, Gu T, Chen B, Bi H, Hu Y. Mechanical, thermal properties and shape memory behaviors of <sc>PLA</sc> / <sc>PCL</sc> / <sc>PLA-g-GMA</sc> blends. *Polym Eng Sci*. 2023;63(7):2084-2092. doi:10.1002/pen.26347
 21. Kuru Z, Kaya MA. Improving the Properties of Biodegradable PLA via Blending with Polyesters for Industrial Applications. *Eur J Res Dev*. 2022;2(4):299-318. doi:10.56038/ejrnd.v2i4.201
 22. Olejnik O, Masek A, Zawadzillo J. Processability and mechanical properties of thermoplastic polylactide/polyhydroxybutyrate (PLA/PHB) bioblends. *Materials (Basel)*. 2021;14(4):1-12. doi:10.3390/ma14040898
 23. Pietrosanto A, Scarfato P, Di Maio L, Incarnato L. Development of PLA / PHB blown films with improved performance for food packaging applications. *Chem Eng Trans*. 2021;87(May):91-96. doi:10.3303/CET2187016
 24. Chiulan I, Mihaela Panaitescu D, Nicoleta Frone A, et al. Biocompatible polyhydroxyalkanoates/bacterial cellulose composites: Preparation, characterization, and in vitro evaluation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2016;104(10):2576-2584. doi:10.1002/jbm.a.35800
 25. Martinez-Sanz M, Oiveira CC, Reis M, Lagaron JM. Special Issue : Bio-based Packaging Special Issue : Bio-based Packaging. *APPL POLYMSCI*.

- Published online 2015. doi:10.1002/app.42971
26. Kaur P, Sharma N, Munagala M, et al. Nanocellulose: Resources, Physio-Chemical Properties, Current Uses and Future Applications. *Front Nanotechnol.* 2021;3. doi:10.3389/fnano.2021.747329
 27. Reshmy R, Philip E, Madhavan A, et al. Biorefinery aspects for cost-effective production of nanocellulose and high value-added biocomposites. *Fuel.* 2022;311:122575. doi:10.1016/j.fuel.2021.122575
 28. Oksman K, Aitomäki Y, Mathew AP, et al. Review of the recent developments in cellulose nanocomposite processing. *Compos Part A Appl Sci Manuf.* 2016;83:2-18. doi:10.1016/j.compositesa.2015.10.041
 29. Almasi H, Ghanbarzadeh B, Dehghannya J, Entezami AA, Asl AK. ScienceDirect Novel nanocomposites based on fatty acid modified cellulose nanofibers / poly (lactic acid): Morphological and physical properties. *Food Packag Shelf Life.* Published online 2015:1-11. doi:10.1016/j.fpsl.2015.04.003
 30. Avila Ramirez JA. OBTENCIÓN Y ESTERIFICACIÓN SOSTENIBLE DE NANOCELULOSA BACTERIANA PARA USOS QUE REQUIEREN REGULAR LA POLARIDAD DE LAS NANOFIBRAS. *ITPN-UBA-CONICET.* Published online 2019.
 31. Gómez FN, Combariza MY, Blanco-Tirado C. Facile cellulose nanofibrils amidation using a 'one-pot' approach. *Cellulose.* 2017;24(2):717-730. doi:10.1007/s10570-016-1174-9
 32. Ting ZX, Yan LJ. Effects of Bacterial Cellulose Whisker Melting Composite on Crystallization and Mechanical Properties of PHBV Composites. *Macromol Res.* 2022;30(5):325-333. doi:10.1007/s13233-022-0039-3
 33. Corredor Ariza LF. Aprovechamiento de biomasa como aditivo para la generación de películas de base polimérica poliácido láctico (PLA) y polietileno (PE) para la conservación de frutas Aprovechamiento de biomasa como aditivo para la generación de películas de base polimé. *Univ Nac Colomb.* Published online 2022.
 34. Inma Gonzalvo A. 5 factores clave en el diseño del envase para garantizar

- la seguridad y vida útil. Interempresas. Published 2020.
<https://www.interempresas.net/Alimentaria/Articulos/304752-5-factores-clave-en-el-diseno-del-envase-para-garantizar-la-seguridad-y-vida-util.html>
35. Wahome PK. THE MANAGEMENT OF POST-HARVEST LOSSES OF TOMATO IN DEVELOPING COUNTRIES Paul K . Wahome Department of Horticulture , Faculty of Agriculture , Luyengo Campus , University of Eswatini , Private Bag Luyengo , M205 , Eswatini Email address : wahome@uniswa.sz. 2019;20.
 36. Luchsinger L. Impacto de la postcosecha en la calidad de frutas de exportación. Redagricola. Published 2021. Accessed June 15, 2022.
<https://www.redagricola.com/co/impacto-de-la-postcosecha-en-la-calidad-de-frutas-de-exportacion/>
 37. O'Sullivan MG. Packaging Technologies for Maintaining Sensory Quality. In: *A Handbook for Sensory and Consumer-Driven New Product Development*. Elsevier; 2017:125-149. doi:10.1016/B978-0-08-100352-7.00007-5
 38. Figueroa-Lopez KJ, Vicente AA, Reis MAM, Torres-Giner S, Lagaron JM. Antimicrobial and antioxidant performance of various essential oils and natural extracts and their incorporation into biowaste derived poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) layers made from electrospun ultrathin fibers. *Nanomaterials*. 2019;9(2):1-22. doi:10.3390/nano9020144
 39. Zheng H, Tang H, Yang C, et al. Evaluation of the slow-release polylactic acid/polyhydroxyalkanoates active film containing oregano essential oil on the quality and flavor of chilled pufferfish (*Takifugu obscurus*) fillets. *Food Chem*. 2022;385(March). doi:10.1016/j.foodchem.2022.132693
 40. Rech CR, Brabes KCS, Silva BEB, et al. Antimicrobial and Physical–Mechanical Properties of Polyhydroxybutyrate Edible Films Containing Essential Oil Mixtures. *J Polym Environ*. 2021;29(4):1202-1211. doi:10.1007/s10924-020-01943-0
 41. Lorenzetti ER, Monteiro FP, Souza PE, et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. *Rev*

- Bras Plantas Med.* 2011;13(spe):619-627. doi:10.1590/s1516-05722011000500019
42. Li S, Jiang Y, Wang M, et al. 3D printing of essential oil/ β -cyclodextrin/popping candy modified atmosphere packaging for strawberry preservation. *Carbohydr Polym.* 2022;297(May). doi:10.1016/j.carbpol.2022.120037
43. Tančinová D, Mašková Z, Mendelová A, Foltinová D, Barboráková Z, Medo J. Antifungal Activities of Essential Oils in Vapor Phase against *Botrytis cinerea* and Their Potential to Control Postharvest Strawberry Gray Mold. *Foods.* 2022;11(19). doi:10.3390/foods11192945
44. Rusková M, Opálková Šišková A, Mosnáčková K, et al. Biodegradable Active Packaging Enriched with Essential Oils for Enhancing the Shelf Life of Strawberries. *Antioxidants.* 2023;12(3). doi:10.3390/antiox12030755
45. Hasirci V, Huri PY, Tanir TE, Eke G, Hasirci N. 1.22 Polymer Fundamentals: Polymer Synthesis ☆. In: *Comprehensive Biomaterials II.* Elsevier; 2017:478-506. doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.10208-5
46. Benson A. Synthetic Polymers: Polyesters, Polyethers, Polysulfones, and Other Polymers. In: *Patty's Toxicology.* Wiley; 2012:965-998. doi:10.1002/0471435139.tox092.pub2
47. Skidmore E. Chemical Compatibility of Polymers. *J Fail Anal Prev.* 2011;11(4):393-397. doi:10.1007/s11668-011-9465-9
48. Gross RA, Kalra B. Biodegradable Polymers for the Environment. 2002;297(4):803-808.
49. Rosales A de los A. Departamento de Química TÍTULO : Obtención de biopolímero plástico a partir del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*), por el método de polimerización por condensación en el Mayo – Abril 2016. Published online 2016.
50. Valero-valdivieso MF. BIOPOLÍMEROS : AVANCES Y PERSPECTIVAS BIOPOLYMERS : PROGRESS AND PROSPECTS. Published online 2013:171-180.
51. Moola AK, Prabhakar MR, Dey B, et al. Biopolymeric composite materials

- for environmental applications. *Phys Sci Rev*. Published online April 19, 2023. doi:10.1515/psr-2022-0223
52. Caillol S. Special Issue "Natural Polymers and Biopolymers II." *Molecules*. 2020;26(1):112. doi:10.3390/molecules26010112
53. Borůvka M, Běhálek L, Habr J, Lenfeld P, Vácha J, Ngaowthong C. Properties of injection molded nanocomposites and blends based on PLA, PHBV and L-CNC. *J Mech Eng*. 2017;SI 4(3):128-141.
54. Kerketta A, Vasanth D. Madhuca indica flower extract as cheaper carbon source for production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem*. 2019;87(August):1-9. doi:10.1016/j.procbio.2019.09.013
55. McAdam B, Brennan Fournet M, McDonald P, Mojicevic M. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers (Basel)*. 2020;12(1):1-20.
56. Luzi F, Dominici F, Armentano I, et al. Combined effect of cellulose nanocrystals, carvacrol and oligomeric lactic acid in PLA-PHB polymeric films. *Carbohydr Polym*. 2019;223(April):115131. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115131
57. Kuciel S, Mazur K, Jakubowska P. Novel Biorenewable Composites Based on Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with Natural Fillers. *J Polym Environ*. 2019;27(4):803-815. doi:10.1007/s10924-019-01392-4
58. Chiulan I, Frone AN, Brandabur C, Panaitescu DM. Recent advances in 3D printing of aliphatic polyesters. *Bioengineering*. 2018;5(1). doi:10.3390/bioengineering5010002
59. Li L, Huang W, Wang B, Wei W, Gu Q, Chen P. Properties and structure of polylactide/poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PLA/PHBV) blend fibers. *Polymer (Guildf)*. 2015;68:183-194. doi:10.1016/J.POLYMER.2015.05.024
60. Modi S, Koelling K, Vodovotz Y. Assessing the mechanical, phase inversion, and rheological properties of poly-[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-

- hydroxyvalerate] (PHBV) blended with poly-(l-lactic acid) (PLA). *Eur Polym J.* 2013;49(11):3681-3690. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.07.036
61. Gerard T, Budtova T. Morphology and molten-state rheology of polylactide and polyhydroxyalkanoate blends. *Eur Polym J.* 2012;48(6):1110-1117. doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.03.015
62. Kanda GS, Al-Qaradawi I, Luyt AS. Morphology and property changes in PLA/PHBV blends as function of blend composition. *J Polym Res.* 2018;25(9). doi:10.1007/S10965-018-1586-3
63. Jost V, Kopitzky R. Blending of polyhydroxybutyrate-co-valerate with polylactic acid for packaging applications - Reflections on miscibility and effects on the mechanical and barrier properties. *Chem Biochem Eng Q.* 2015;29(2):221-246. doi:10.15255/CABEQ.2014.2257
64. Mazur KE, Jakubowska P, Gaweł A, Kuciel S. Mechanical, thermal and hydrodegradation behavior of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) composites with agricultural fibers as reinforcing fillers. *Sustain Mater Technol.* 2022;31(October 2021). doi:10.1016/j.susmat.2022.e00390
65. Rivera-Briso AL, Serrano-Aroca Á. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications. *Polymers (Basel).* 2018;10(7):732. doi:10.3390/polym10070732
66. Dasan YK, Bhat AH, Ahmad F. Polymer blend of PLA/PHBV based bionanocomposites reinforced with nanocrystalline cellulose for potential application as packaging material. *Carbohydr Polym.* 2017;157:1323-1332. doi:10.1016/J.CARBPOL.2016.11.012
67. Bledzki AK, Jaszkiwicz A. Mechanical performance of biocomposites based on PLA and PHBV reinforced with natural fibres - A comparative study to PP. *Compos Sci Technol.* 2010;70(12):1687-1696. doi:10.1016/j.compscitech.2010.06.005
68. Zhao H, Cui Z, Wang X, Turng LS, Peng X. Processing and characterization of solid and microcellular poly(lactic acid)/polyhydroxybutyrate-valerate (PLA/PHBV) blends and PLA/PHBV/Clay nanocomposites. *Compos Part B Eng.* 2013;51:79-91. doi:10.1016/J.COMPOSITESB.2013.02.034

69. Zubir NHM, Sam ST, Zulkepli NN, Omar MF. The effect of rice straw particulate loading and polyethylene glycol as plasticizer on the properties of polylactic acid/polyhydroxybutyrate-valerate blends. *Polym Bull.* 2018;75(1):61-76. doi:10.1007/s00289-017-2018-y
70. Valle Iulianelli GC, Costa LV, da Silva PSC, dos Santos FA. Evaluation of Fully Biodegradable PLA/PHB Blend Filled with Microcrystalline Celluloses. *Mater Res.* 2023;26:16-18. doi:10.1590/1980-5373-MR-2022-0433
71. Ting ZX, Yan LJ. Effects of Bacterial Cellulose Whisker Melting Composite on Crystallization and Mechanical Properties of PHBV Composites. *Macromol Res* 2022 305. 2022;30(5):325-333. doi:10.1007/S13233-022-0039-3
72. Yu HY, Qin ZY, Wang LF, Zhou Z. Crystallization behavior and hydrophobic properties of biodegradable ethyl cellulose-g-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): The influence of the side-chain length and grafting density. *Carbohydr Polym.* 2012;87(4):2447. doi:10.1016/j.carbpol.2011.11.022
73. Dufresne A. 5 Chemical modification of nanocellulose. In: *Nanocellulose.* DE GRUYTER; 2012:147-192. doi:10.1515/9783110254600.147
74. Kale BM, Rwahwire S, Kale NK, Musinguzi WB. PLA composite films based on acetate substituted microcrystalline cellulose. *Key Eng Mater.* 2019;801 KEM:133-138. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.801.133
75. Fern A. Máster en Ingeniería Agronómica “ Evaluación de aceites esenciales de. Published online 2018.
76. Cevallos V, Londoño L. ACEITES ESENCIALES EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS Valeria Ceballos Toro , Lina M. Londoño Giraldo. Published online 2018:1-13. file:///H:/3659-Texto del artículo-6039-1-10-20181029.pdf
77. Basso CN, Sosa MC, Lutz MC. EARLY INFECTIONS BY *Botrytis cinerea* AND *Alternaria* spp. AND THEIR RELATIONSHIP WITH POSTHARVEST ROT IN D'ANJOU PEAR. *Chilean Journal of Agricultural and Animal*

- Sciences. doi:10.29393/CHJAA38-30JUBF10030
78. Tančinovsı D, Maskovsı Z, Mendélovı A, Foltinovsı D, Barboursımetalsı Z, Medo J. Actividades antifúngicas de los aceites esenciales en fase de vapor contra botrytis cinérea y su potencial para controlar el moho gris de la fresa en poscosecha. Published online 2022:12-18.
 79. Valkov V, Duranov H, Galoviov L, et al. Cymbopogon citratus Essential Oil: Its Application as an Antimicrobial Agent in Food Preservation. *Agronomy*. 2022;12(1). doi:10.3390/agronomy12010155
 80. Majewska E, Kozłowska M, Gruczynska-Sekowska E, Kowalska D, Tarnowska K. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil: Extraction, composition, bioactivity and uses for food preservation - A review. *Polish J Food Nutr Sci*. 2019;69(4):327-341. doi:10.31883/pjfn/113152
 81. Kawhena TG, Opara UL, Fawole OA. A comparative study of antimicrobial and antioxidant activities of plant essential oils and extracts as candidate ingredients for edible coatings to control decay in 'wonderful' pomegranate. *Molecules*. 2021;26(11). doi:10.3390/molecules26113367
 82. V D, Biswal A, Sellamuthu PS, J J, Sadiku ER. PVA/essential oil-based active food packaging films functionalised with halloysite nanotubes and cellulose nanocrystals as filler materials for the shelf-life extension of papaya fruits. *Int J Food Sci Technol*. 2024;59(1):318-332. doi:10.1111/ijfs.16811
 83. Hager J V., Rawles SD, Xiong YL, Newman MC, Webster CD. Edible Corn-zein-based Coating Incorporated with Nisin or Lemongrass Essential Oil Inhibits *Listeria monocytogenes* on Cultured Hybrid Striped Bass, *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*, Fillets During Refrigerated and Frozen Storage. *J World Aquac Soc*. 2019;50(1):204-218. doi:10.1111/jwas.12523
 84. Nkede FN, Wardana AA, Phuong NTH, et al. Preparation and Characterization of Chitosan/Lemongrass Oil/Cellulose Nanofiber Pickering Emulsions Active Packaging and Its Application on Tomato Preservation. *J Polym Environ*. 2023;31(11):4930-4945. doi:10.1007/s10924-023-02885-z
 85. Plastics Europe. Plastics-Situación en 2022. Published online 2022.

- <https://plasticseurope.org/es/wp-content/uploads/sites/4/2023/02/PLASTICOS-SITUACION-2022-esp.pdf>
86. Castellanos DA, Herrera DR, Herrera AO. Modelling water vapour transport, transpiration and weight loss in a perforated modified atmosphere packaging for feijoa fruits. *Biosyst Eng.* 2016;151:218-230. doi:10.1016/j.biosystemseng.2016.08.015
 87. Garavito J. EVALUACIÓN DE SISTEMAS DE EMPAQUE BIODEGRADABLES CON ATMÓSFERAS MODIFICADAS EN EQUILIBRIO PARA FRUTOS DE UCHUVA (*Physalis peruviana*). Published online 2021.
 88. Esparza AL. Sistemas De Alta Barrera En Empaques Flexibles. *Cent Investig En Química Apl.* Published online 2008:78.
 89. Li W, Cai G, Zhang P. A simple and rapid Fourier transform infrared method for the determination of the degree of acetyl substitution of cellulose nanocrystals. *J Mater Sci.* 2019;54(10):8047-8056. doi:10.1007/s10853-019-03471-2
 90. Lohn Pereira NR, Lopes B, Fagundes IV, et al. Bio-packaging based on cellulose acetate from banana pseudostem and containing *Butia catarinensis* extracts. *Int J Biol Macromol.* 2022;194(November 2021):32-41. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.11.179
 91. ASTM International. ASTM D570-89 Método de prueba estándar para la absorción de agua de plásticos. *Am Soc Test Mater.* Published online 1998.
 92. (ICONTEC) IC de NT y C. *NTC 3929 ANÁLISIS SENSORIAL. METODOLOGÍA. MÉTODOS DEL PERFIL DEL SABOR.*; 2021.
 93. Dhar P, Bhardwaj U, Kumar A, Katiyar V. Investigaciones sobre el comportamiento reológico y mecánico de nanobiocompuestos basados en nanocristales de poli (3- hidroxibutirato) / celulosa. Published online 2015.
 94. Ribeiro FA dos SV, Cavalcante M de P, Tavares MIB, Melo ARA. Effect of modified microcrystalline cellulose on poly(3-hydroxybutyrate) molecular dynamics by proton relaxometry. *Polym Polym Compos.* 2021;29(5):553-560. doi:10.1177/0967391120926078

95. Takkalkar P, Tobin MJ, Vongsvivut J, et al. Structural, thermal, rheological and optical properties of poly(lactic acid) films prepared through solvent casting and melt processing techniques. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2019;104:293-300. doi:10.1016/j.jtice.2019.08.018
96. Mendes ÍML, Fialho MSB, Leão RM, Silveira EA, Luz SM da. Processing Biodegradable Blends of Hemicellulose with Polyhydroxybutyrate and Poly (Lactic Acid). *Mater Res.* 2023;26. doi:10.1590/1980-5373-mr-2022-0390
97. Anbukarasu P, Sauvageau D, Elias A. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. *Sci Rep.* 2015;5(1):17884. doi:10.1038/srep17884
98. Antunes A, Luyt AS, Popelka A, et al. Influence of accelerated weathering on the physical and structural properties of poly(Lactic-acid)/ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (pla/phbv) blends. *Express Polym Lett.* 2021;15(8):687-707. doi:10.3144/expresspolymlett.2021.58
99. Snowdon MR, Mohanty AK, Misra M. Miscibility and Performance Evaluation of Biocomposites Made from Polypropylene/Poly(lactic acid)/Poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) with a Sustainable Biocarbon Filler. *ACS Omega.* 2017;2(10):6446-6454. doi:10.1021/acsomega.7b00983
100. Boufarguine M, Guinault A, Miquelard-Garnier G, Sollogoub C. PLA/PHBV films with improved mechanical and gas barrier properties. *Macromol Mater Eng.* 2013;298(10):1065-1073. doi:10.1002/mame.201200285
101. Hernández Martín D. Comportamiento Frente a Impacto De Polímeros Termoplásticos En Aplicaciones Aeronáuticas : *Univ Carlos III Madrid.* Published online 2015.
102. Mohan Bhasney S, Kumar A, Katiyar V. Microcrystalline cellulose, polylactic acid and polypropylene biocomposites and its morphological, mechanical, thermal and rheological properties. *Compos Part B Eng.* 2020;184(August 2019):107717. doi:10.1016/j.compositesb.2019.107717
103. Aguiar GPS, Magro CD, Oliveira J V., Lanza M. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) micronization by solution enhanced dispersion by supercritical fluids technique. *Brazilian J Chem Eng.* 2018;35(4):1275-1282.

- doi:10.1590/0104-6632.20180354s20170501
104. Abdelwahab MA, Flynn A, Chiou B Sen, Imam S, Orts W, Chiellini E. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polym Degrad Stab.* 2012;97(9):1822-1828. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.036
 105. Arrieta MP, Fortunati E, Dominici F, Rayón E, López J, Kenny JM. Multifunctional PLA-PHB/cellulose nanocrystal films: Processing, structural and thermal properties. *Carbohydr Polym.* 2014;107(1):16-24. doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.044
 106. Shaikh HM, Anis A, Poulouse AM, et al. Synthesis and Characterization of Cellulose Triacetate Obtained from Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Trunk Mesh-Derived Cellulose. *Molecules.* 2022;27(4). doi:10.3390/molecules27041434
 107. Nu DTT, Hung NP, Van Hoang C, Van der Bruggen B. Preparation of an asymmetric membrane from sugarcane bagasse using DMSO as green solvent. *Appl Sci.* 2019;9(16). doi:10.3390/app9163347
 108. Bamba M, Assanvo EF, Kouassi EKA, et al. Preparation and Characterization of Cellulose Triacetate from Cocoa Pod Husk. *BioResources.* 2023;18(1):1684-1698. doi:10.15376/biores.18.1.1684-1698
 109. Dong F, Yan M, Jin C, Li S. Characterization of type-II acetylated cellulose nanocrystals with various degree of substitution and its compatibility in PLA films. *Polymers (Basel).* 2017;9(8):1-14. doi:10.3390/polym9080346
 110. Deng H, Reynolds CT, Cabrera NO, Barkoula NM, Alcock B, Peijs T. The water absorption behaviour of all-polypropylene composites and its effect on mechanical properties. *Compos Part B Eng.* 2010;41(4):268-275. doi:10.1016/j.compositesb.2010.02.007
 111. Ismaeil G, Behzad K. Long-term Water Absorption Behaviour of Polypropylene/Wood Flour/Organoclay Hybrid Nanocomposite. *Iran Polym J.* Published online 2009:683-691.
 112. Davidson PM, Taylor TM, David JRD. *Antimicrobials in Food.* (Davidson

- PM, Taylor TM, David JRD, eds.). CRC Press; 2020.
doi:10.1201/9780429058196
113. Monu EA, David JRD. Use of Antimicrobials as Processing Aids in Food Processing. In: *Antimicrobials in Food*. CRC Press; 2020:647-664.
doi:10.1201/9780429058196-19
114. El-Morsy M, Koriem A, Tawfik A, Elian M. STUDIES ON STRAWBERRY FRUIT ROT INCITED BY *Botrytis cinerea*. *J Product Dev*. 2022;27(3):331-338. doi:10.21608/jpd.2022.255045
115. Jiang B, Li R, Fang X, et al. *Botrytis cinerea* infection affects wax composition, content and gene expression in blueberry fruit. *Postharvest Biol Technol*. 2022;192:112020. doi:10.1016/j.postharvbio.2022.112020
116. Liu P, Shen J, Wang Y, et al. Effect of p-coumarate esters resistant against postharvest *Botrytis cinerea* infection in apple fruit. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2022;297:110926. doi:10.1016/j.scienta.2022.110926
117. Agnish S, Sharma AD, Kaur I. Nanoemulsions (O/W) containing *Cymbopogon pendulus* essential oil: development, characterization, stability study, and evaluation of in vitro anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-diabetic activities. *Bionanoscience*. 2022;12(2):540-554.
doi:10.1007/s12668-022-00964-4