



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS A  
BASE DE QUITOSANO, CELULOSA Y NANOCRISTALES DE  
CELULOSA DE OLOTE DE MAÍZ (*Zea mays*, ssp. *mays*)”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

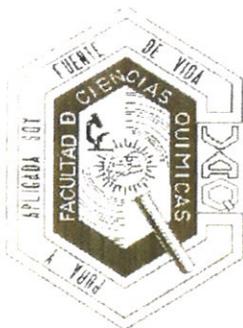
PRESENTA

**MÓNICA CITLALI GARCÍA GARCÍA**

DIRIGIDA POR

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS A  
BASE DE QUITOSANO, CELULOSA Y NANOCRISTALES DE  
CELULOSA DE OLOTE DE MAÍZ (*Zea mays*, ssp. *mays*)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

MÓNICA CITLALI GARCÍA GARCÍA

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

DIRECTOR

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

SINODAL

Dra. HILDA MARÍA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

SINODAL

Dr. JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ

SINODAL

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque Él que creó el Universo y sus creaturas, creyó que el mundo me necesitaba también. Y porque cuando Él está en mi barca, no importa el tamaño de las olas.

A mi mamá, por darme la vida, por enseñarme a amar a Dios, por dedicarme todo su tiempo, por ser un gran ejemplo para mí, por guiarme, por enseñarme a trabajar y a luchar por mis sueños, y por su infinito amor. A mi papá por su apoyo, guía y consejos llenos de amor.

A mi Prince, por su amor y lealtad durante todo este camino, aunque ya no esté aquí para ver el final.

A mis padrinos, familia y amigos, por acompañarme en esta importante etapa de mi vida, brindándome su amor y apoyo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por la formación brindada y por darme las bases para convertirme en una profesionista comprometida con la sociedad.

A todos mis maestros, por compartir sus conocimientos y prepararme no sólo para el trabajo, sino para la vida.

A la Dra. Monserrat Escamilla, por adoptarnos como sus “hijos” y dedicarnos su cariño, tiempo y esfuerzo, y por impulsarnos y ayudarnos a descubrir el mundo de la investigación; mi vida sería muy diferente si usted no nos hubiera invitado a trabajar en el laboratorio, y por eso siempre le estaré agradecida.

Al Dr. Carlos Regalado y a la Dra. Blanca García por la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos y por su guía. A mi comité de tesis, por su asesoría y valiosas opiniones en la realización de este trabajo.

Al Fondo para Proyectos Estudiantiles (FOPES), del programa “Química Somos Todos 2019” de la Facultad de Química, por el financiamiento otorgado.

Al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) y a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), por su colaboración y apoyo para el desarrollo de la presente tesis.

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”.

Albert Einstein

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Empacado de alimentos	1
1.2 Películas y/o recubrimientos biodegradables	2
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de las películas	2
1.3 Polímeros biodegradables	3
1.3.1 Quitosano	4
1.3.2 Celulosa	5
1.4 Residuos agroindustriales como fuente de celulosa	6
1.4.1 Olate de maíz	7
1.4.1.1 Producción de olate de maíz	7
1.4.1.2 Composición del olate de maíz	7
1.4.1.3 Usos de olate de maíz	8
1.5 Extracción de celulosa	8
1.6 Nanocristales de celulosa	9
1.7 Plastificantes	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 General	12
3.2 Específicos	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Materiales	13
4.2 Métodos	13

4.2.1 Extracción de celulosa	13
4.2.2 Producción de nanocristales de celulosa	14
4.2.3 Rendimiento de celulosa y de nanocristales de celulosa	16
4.2.4 Elaboración de películas de celulosa, nanocristales de celulosa y quitosano	16
4.2.5 Caracterización de las películas	17
4.2.5.1 Contenido de humedad	17
4.2.5.2 Solubilidad en agua	18
4.2.5.3 Permeabilidad al vapor de agua	19
4.2.5.4 Determinación del espesor	20
4.2.5.5 Propiedades mecánicas	21
4.2.5.6 Color	22
4.2.5.7 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).	22
4.2.5.8 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	23
4.2.5.9 Biodegradabilidad de las películas	23
4.2.5.10 Compostabilidad de las películas	24
4.2.6 Análisis estadístico	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Extracción de celulosa y de nanocristales de celulosa	26
5.2 Rendimiento de celulosa y nanocristales de celulosa	26
5.3 Elaboración de películas de celulosa, nanocristales de celulosa y quitosano	27
5.4 Caracterización de las películas	28
5.4.1 Propiedades físicas de películas biodegradables.	28
5.4.2 Espesor y Resistencia a la tensión	29
5.4.3 Color	30
5.4.4 Características topográficas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	31
5.4.5 Espectroscopía FTIR	32
5.4.6 Ensayo de biodegradabilidad	33

5.4.7 Compostabilidad de las películas	36
6. DISCUSIÓN	37
6.1 Extracción de celulosa y de nanocristales de celulosa	37
6.2 Rendimiento de celulosa y de nanocristales de celulosa	39
6.3 Elaboración de películas de celulosa, nanocristales de celulosa y quitosano	39
6.4 Caracterización de las películas	41
6.4.1 Contenido de humedad	41
6.4.2 Solubilidad en agua	42
6.4.3 Permeabilidad al vapor de agua	42
6.4.4 Espesor	43
6.4.5 Resistencia a la tensión	44
6.4.6 Color	44
6.4.7 Características topográficas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	45
6.4.8 Espectroscopía FTIR	46
6.4.9 Ensayo de biodegradabilidad	47
6.4.10 Compostabilidad de las películas	48
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	61

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Concentración de los diferentes componentes de cada película elaborada.	16
2	Escala para la evaluación del crecimiento de hongos durante la prueba de biodegradabilidad.	24
3	Rendimiento de la extracción de celulosa y nanocristales de celulosa a partir del olote.	27
4	Contenido de humedad (CH), solubilidad en agua (SA) y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las diferentes películas evaluadas.	29
5	Espesor (E) y resistencia a la tensión (RT) de las diferentes películas evaluadas.	30
6	Parámetros de color: valor cromático ( $a^*$ y $b^*$ ), luminosidad ( $L^*$ ) y diferencia de color ( $\Delta E$ ) de las películas evaluadas.	31
7	Parámetros de rugosidad ( $R_a$ y $R_q$ ) de las películas evaluadas.	31
8	Porcentaje de compostabilidad de las diferentes películas evaluadas.	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura jerárquica de la celulosa.	6
2	Secado y molienda del olote.	13
3	Diagrama general del tratamiento alcalino del olote.	14
4	Diagrama general de la etapa de blanqueamiento del olote.	14
5	Diagrama general de la producción de nanocristales de celulosa (parte 1).	15
6	Diagrama general de la producción de nanocristales de celulosa (parte 2).	15
7	Preparación soluciones de a) quitosano, b) celulosa.	17
8	Diagrama general de la elaboración de las películas.	17
9	Diagrama general del análisis de solubilidad de las películas.	18
10	Diagrama de la permeabilidad al vapor de agua.	19
11	Medición del espesor de las películas.	21
12	Análisis de RT de las películas.	21
13	Ensayo de compostabilidad.	25
14	Tratamientos aplicados al olote para la obtención de nanocristales de celulosa.	26
15	Apariencia de las películas elaboradas.	28
16	Apariencia de las películas a) antes y b) después de sumergirse durante 24 h en agua.	29
17	Micrografías de las películas (1 $\mu\text{m}$ x 1 $\mu\text{m}$ ) de a) celulosa, b) nanocristales de celulosa y c) quitosano.	32
18	Espectrogramas IR de a) celulosa, b) película de C:Q y c) C:NC:Q.	34
19	Biodegradabilidad de las películas.	35
20	Progresión de la biodegradabilidad de las películas.	66
21	Pérdida de peso de las diferentes películas a lo largo del proceso de compostaje (12 días).	67

## RESUMEN

El empaque de alimentos permite protegerlos de posibles riesgos, asegurar su calidad, aumentar su vida de anaquel, así como minimizar pérdidas. Debido al aumento de la demanda de los consumidores por materiales más sustentables en la elaboración de empaques, se propone el uso de biopolímeros como alternativas para reducir el impacto de los plásticos en el ambiente. La celulosa y quitosano son biopolímeros atractivos para la elaboración de películas debido a su gran abundancia, biodegradabilidad y baja toxicidad. El objetivo del presente trabajo es elaborar películas a base de quitosano (Q), celulosa (C) y nanocristales de celulosa (NC). Se evaluaron las propiedades físicoquímicas, mecánicas y de barrera de estas películas, así como su biodegradabilidad. Las películas de C:Q y C:NC:Q, comparadas con las de Q, presentaron menor humedad ( $20.07 \pm 1.02$  y  $17.19 \pm 1.11$  %), solubilidad en agua ( $17.44 \pm 0.57$  y  $19.80 \pm 1.62$  %) y luminosidad ( $87.67 \pm 0.17$  y  $89.80 \pm 0.66$ ), tuvieron valores más altos en cuanto a su espesor ( $615.93 \pm 30.03$  y  $632.70 \pm 15.1$   $\mu\text{m}$ ) y rugosidad ( $R_q$ :  $2.23 \pm 0.35$  y  $4.90 \pm 0.98$  nm), y presentaron una biodegradabilidad mayor. Comparando las películas de C:Q y C:NC:Q, las que se elaboraron con los NC presentaron una mejora en sus propiedades de barrera (PVA:  $1.05 \pm 0.15 \times 10^{-12}$   $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ). No se observaron diferencias significativas en las propiedades mecánicas de las tres películas. Por medio de la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se comprobaron las interacciones moleculares del quitosano con la C y los NC. Gracias a su biodegradabilidad y propiedades de barrera mejoradas, las películas desarrolladas podrían ser utilizadas como un sustituto de materiales no sustentables utilizados en el empaque de alimentos.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Empacado de alimentos

El empackado de alimentos se utiliza para proteger al alimento de posibles riesgos físicos, químicos y biológicos que se presentan durante su almacenamiento y distribución (Karmaus y col., 2018). El empackado es clave para asegurar la calidad y seguridad del alimento, proporcionar mayor vida de anaquel y a su vez minimizar pérdidas (Mphahlele y col., 2020; Wang y col., 2020).

El plástico es el material más usado en el empackado de alimento (bolsas, botellas, charolas, etc.), ya que permite mantener la calidad y seguridad del alimento desde el momento de su empackado hasta que llega al consumidor final, debido a su gran disponibilidad y bajo costo, características mecánicas como alta tensión y resistencia a la tensión, así como las características físicas deseadas en cuanto a suavidad, ligereza y transparencia (Geueke y col., 2018). Los plásticos más utilizados para este fin son, polietilén tereftalato (PET), cloruro de polivinilo (PVC), polietileno de alta (PEAD) y baja densidad (PEBD), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y poliamida (Cherif Lahimer y col., 2017).

De acuerdo con Espitia y col. (2014), menos del 5% de todos los plásticos son reciclados. Estos materiales requieren cientos de años para degradarse en sus componentes básicos después de su uso debido a su resistencia a la degradación microbiana, entre otras causas. Millones de toneladas de plásticos son depositados en rellenos sanitarios, incrementando cada año las dificultades para eliminar los desechos. El impacto ambiental causado por la industria del empackado es alto; en particular, la fabricación de empaques plásticos para alimentos genera una gran cantidad de desperdicio, debido a su corta vida útil (Leceta y col., 2013). Otra desventaja es que la industria del plástico es altamente dependiente del petróleo y, en consecuencia, el incremento en los precios del petróleo y del gas natural puede tener un gran impacto económico en el mercado del plástico (Azeredo y col., 2016).

Actualmente la demanda de los consumidores por materiales más sustentables, que

permitan reducir la cantidad de desechos plásticos ha ido en aumento; por lo anterior, ha habido un gran interés por parte de la industria para producir materiales más amigables con el ambiente, que sean biodegradables, renovables y de un costo competitivo (Ibrahim y El-Khawas, 2019).

## 1.2 Películas y/o recubrimientos biodegradables

La industria alimentaria está desarrollando constantemente nuevas tecnologías en el área de materiales de empaque que aseguren la calidad de los alimentos y que éstos sean seguros para su consumo (Gouvêa y col., 2015; Hamad y col., 2018). Para reemplazar el uso del plástico en la industria del empaque, es necesario desarrollar nuevos tipos de materiales biodegradables que puedan ser fácilmente producidos a partir de recursos renovables, a bajo costo y con buenas propiedades termomecánicas, físicoquímicas y antimicrobianas (Vinod y col., 2020).

Como alternativas se presentan las películas y los recubrimientos elaborados con biopolímeros; las primeras son delgadas capas de materiales biopoliméricos, las cuales una vez formadas, pueden ser colocadas sobre o entre componentes alimenticios o utilizarse para la elaboración de empaques; mientras que un recubrimiento comestible está formado como una cubierta sobre un alimento (Atarés y Chiralt, 2016).

### 1.2.1 Propiedades físicoquímicas de las películas

Para lograr mantener la integridad del empaque durante la manipulación y almacenamiento del producto, es necesario que los materiales de empaque tengan propiedades físicas y mecánicas deseables (Garavand y col., 2017). Las propiedades mecánicas de las películas (resistencia a la tensión, elongación, deformabilidad, módulo elástico, entre otras) dependen principalmente de su estructura química y de su capacidad de formar interacciones moleculares entre las cadenas poliméricas que las componen, manteniéndolas unidas (Thakur y col., 2019).

La caracterización de películas como materiales de empaque debe incluir su análisis

estructural y la medición de sus propiedades. Muchas técnicas pueden ser utilizadas para esto, tales como microscopía de fuerza atómica (AFM) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Además, se deben estudiar propiedades mecánicas como la resistencia a la tensión. La solubilidad, color, permeabilidad al vapor de agua y biodegradabilidad son otras propiedades que también deben ser analizadas para el desarrollo de un nuevo empaque (Calderón-Aguirre y col., 2015; Sahraee y col., 2019).

### 1.3 Polímeros biodegradables

Los polímeros biodegradables o biopolímeros han sido estudiados para su uso como alternativa a los materiales tradicionales utilizados en la elaboración de empaques de alimentos, debido a que las tasas de biodegradación reportadas de estos materiales biopoliméricos, a diferencia de los plásticos, son de meses e incluso días (Azeredo y col., 2016). En el año 2009 los biopolímeros eran usados sólo en una pequeña fracción (<1%) en el mercado de plásticos; sin embargo, se espera que su uso aumente a 20% para el 2020, por lo que se prevé una mayor demanda de este tipo de materiales (Van Den Broek y col., 2015).

Los biopolímeros pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo a su origen y producción. La primera incluye a los polímeros que son directamente extraídos o removidos de la biomasa, como polisacáridos (almidón, celulosa, quitosano, pectinas), proteínas (caseína, colágeno, soya) y lípidos. La segunda categoría son los polímeros producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente, principalmente polihidroxicanoatos (PHAs). El tercer grupo está formado por aquellos polímeros sintetizados químicamente que utilizan monómeros obtenidos de recursos agroindustriales, por ejemplo el ácido poliláctico (PLA) y el alcohol polivinílico (PVA) (Valdés y col., 2014; Moustafa y col., 2019).

En la actualidad se ha intensificado el interés en el desarrollo y la aplicación de películas basadas en biopolímeros de una gran variedad de productos agrícolas o desechos de alimentos, debido a la preocupación acerca de la sobreexplotación de

recursos naturales limitados, como los combustibles fósiles, y del alto impacto ambiental de los empaques fabricados a partir de materiales no biodegradables (Kabir y col., 2020). Estas películas son adecuadas para las características generales del producto en cuanto a calidad y apariencia, pero también para la salud pública, lo cual aumenta el interés del consumidor (Grumezescu y Holban, 2018).

Entre los diferentes polímeros biodegradables utilizados en la elaboración de películas, los polisacáridos han surgido como uno de sus principales componentes debido a su gran abundancia y baja toxicidad. Las películas a base de estos compuestos generalmente son fáciles de elaborar, presentan propiedades mecánicas ad hoc y se degradan en un periodo corto de tiempo (Sousa y Gonçalves, 2015).

### 1.3.1 Quitosano

El quitosano es un heteropolisacárido catiónico compuesto de unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos; en su composición química se encuentran grupos funcionales como aminas primarias (NH) y grupos hidroxilo primarios y secundarios (OH) (Negm y col., 2020). El quitosano se produce por la desacetilación de la quitina, que es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, siendo el principal componente estructural del exoesqueleto de artrópodos, al igual que de las paredes celulares de hongos y levaduras. El exoesqueleto de cangrejos y camarones, obtenidas de residuos de la industria pesquera, son la principal fuente de quitina (Salari y col., 2018).

El quitosano es un compuesto soluble en soluciones ácidas, no tóxico, biodegradable y biocompatible. Debido a sus propiedades catiónicas, el quitosano reacciona con especies cargadas negativamente, lo cual le confiere importantes ventajas para incorporar modificadores de las películas, tales como compuestos funcionales (antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes, nutraceuticos) (Grande-Tovar y col., 2018). Además, posee propiedades antimicrobianas al interactuar con

la pared celular bacteriana, la membrana celular y sus constituyentes citoplasmáticos a través de interacciones electrostáticas (Chao y col., 2019).

Este compuesto tiene la capacidad de formar películas y recubrimientos, por lo que su uso se ha extendido para proteger, mejorar la calidad y aumentar la vida de anaquel de alimentos frescos y procesados (Chaudhary y col., 2020). Las películas a base de quitosano son económicas, translúcidas y permeables al vapor de agua; sin embargo, presentan baja permeabilidad de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, no son termoplásticas y no pueden ser extruidas, moldeadas o estiradas como los materiales de empaque convencionales (Kerch, 2015; Van Den Broek y col., 2015). Estas desventajas del quitosano son atribuidas a su naturaleza hidrofílica; una forma de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de las películas elaboradas con este polisacárido es adicionando agentes de reforzamiento como pueden ser proteínas (soya, colágeno, gelatina) o polisacáridos (almidón, alginato, celulosa) (Kusmono y Abdurrahim, 2019).

### 1.3.2 Celulosa

La celulosa es un homopolisacárido lineal con unidades repetidas de D-glucosa las cuales interactúan entre sí a través de enlaces  $\beta$ -1,4; también hay fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares o intermoleculares entre las unidades de glucosa adyacentes en la misma cadena o en diferentes cadenas a través de los grupos hidroxilo disponibles en los monómeros de glucosa (Sharma y col., 2019).

La celulosa es la fuente de biomasa más abundante en el planeta y uno de los principales componentes de las fibras naturales; la mayor parte de la pared celular vegetal de frutas, vegetales, hojas, troncos y cortezas de árboles está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina, las cuales representan del 35-50 %, del 20-35% y del 10-25% del peso seco de la biomasa, respectivamente (Grumezescu y Holban, 2018; Kaisangsri y col., 2019). La fabricación de películas a base de celulosa les confiere grandes oportunidades para ser utilizadas como alternativas en el empaque debido a que es un material renovable, biodegradable y de bajo costo

(El Halal y col., 2015; Wang y col., 2019). La Figura (1) muestra la estructura jerárquica de la celulosa. Las paredes celulares están compuestas por macrofibras de celulosa rodeadas por hemicelulosa y lignina, formando así una fibra compuesta; las macrofibras se componen de microfibrillas que, a su vez, están formadas con nanofibrillas de celulosa (Kim y col., 2015; Abdul Khalil y col., 2016).

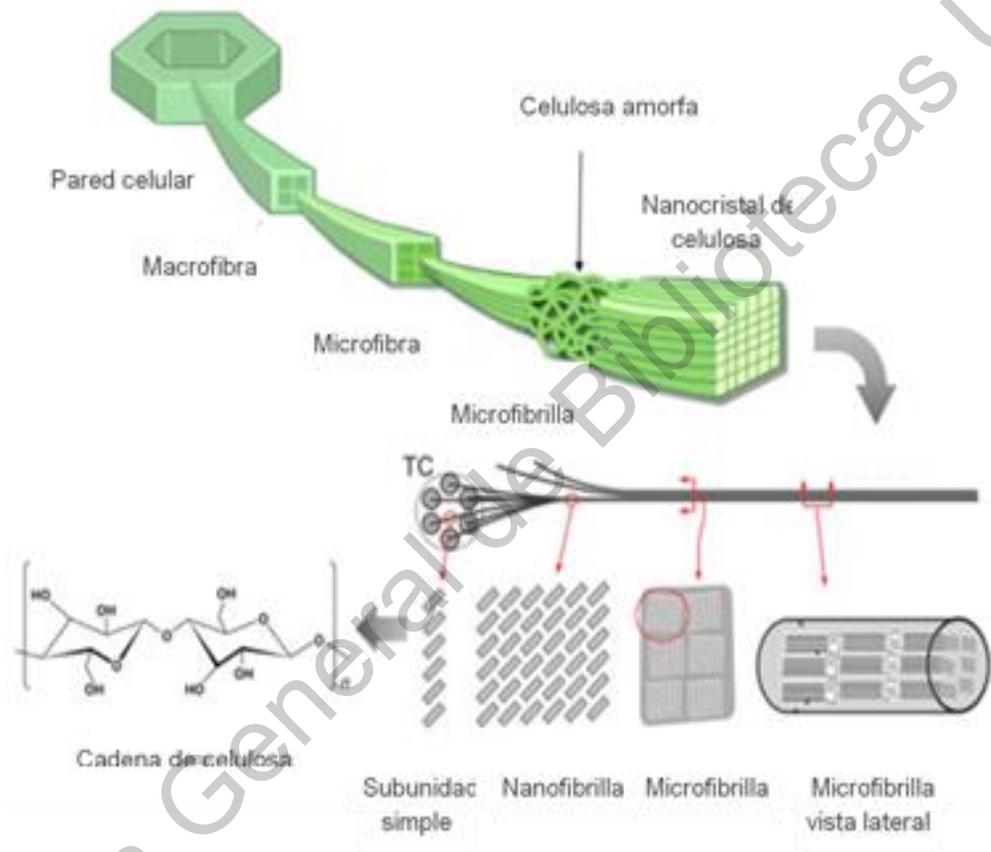


Figura 1. Estructura jerárquica de la celulosa (Kim y col., 2015).

#### 1.4 Residuos agroindustriales como fuente de celulosa

La cantidad de residuos producidos por el aumento en la actividad del sector agrícola representa una fuerte amenaza al ambiente. Los residuos agroindustriales pueden obtenerse a partir de árboles o plantas como el bagazo de caña de azúcar, el maíz, residuos de la palma, entre otros (Navas y col., 2015). Hay dos tipos de residuos resultantes de la cosecha de productos agrícolas: residuos del campo y residuos del proceso. Los residuos del campo se utilizan para cubrir la tierra y protegerla de la

erosión por la lluvia y el viento, así como de la radiación solar y evitar la pérdida de humedad. Los residuos del proceso, en su mayoría, son depositados en el suelo hasta que se queman, generando contaminación ambiental (Mohlala y col., 2016).

Los principales residuos fibrosos producidos por la actividad agrícola se conocen como fibras de celulosa, y tienen un alto potencial para ser utilizados como materiales de refuerzo en la elaboración de empaques debido a que presentan ventajas como una menor densidad, bajo peso, buena adhesión con la matriz polimérica a la que se incorporen, amplia abundancia, biodegradabilidad y bajo costo (Hamidon y col., 2019; Jiang y col., 2020). Asumiendo que el 40% de la producción termina como residuo y que al menos 10% de éste puede ser obtenido como fibras, millones de toneladas métricas de fibras estarían disponibles año con año (Dungani y col., 2016).

#### 1.4.1 Olote de maíz

##### 1.4.1.1 Producción de olote de maíz

El maíz (*Zea mays*) es uno de los productos alimenticios más producidos en el mundo y de mayor importancia. A nivel nacional, para el ciclo primavera-verano 2018 se obtuvo una producción de 13.4 millones de toneladas de maíz, de las cuales, alrededor de 60% corresponde a consumo forrajero y el restante 40% a consumo humano, industrial y semilla (SIAP, 2018). Como un subproducto de la producción del maíz (al separar el grano de la mazorca), se estima que globalmente se generan 164 millones de toneladas de olote al año (170 kg olote / Ton maíz) (Córdoba y col., 2013; Takada y col., 2018).

##### 1.4.1.2 Composición del olote de maíz

De acuerdo al estudio realizado por Pointner y col. (2014), el contenido en peso de hemicelulosa, celulosa y lignina en el olote de maíz fue 44.4%, 38.8% y 5.2%, respectivamente; resaltando como los dos compuestos principales a la hemicelulosa y la celulosa. Otros compuestos presentes también en el olote son grasas (0.3%), almidón (0.67%), proteína (4.26%) y cenizas (2.88%). Takada y col. (2018), reportaron porcentajes similares para la hemicelulosa y celulosa (41.4% y 36.3%,

respectivamente) presentes en el olote; sin embargo, el contenido de lignina cuantificado fue mayor (18.8%).

#### 1.4.1.3 Usos de olote de maíz

El olote de maíz puede ser utilizado como forraje para rumiantes, fertilizante, soporte para disminuir la erosión en la tierra, como sustrato para la producción de xilanasas y en algunos casos como agente reforzante en materiales de construcción. Sin embargo, al ser un residuo del proceso agrícola, su utilización en estos ámbitos es limitada, lo cual ha conducido a su quema o a su esparcimiento en la intemperie, generando un problema de contaminación ambiental (Mohlala y col., 2016; Liu, Wu, y col., 2020).

#### 1.5 Extracción de celulosa

Para obtener las fibras de celulosa es necesario tratamientos físico-químicos alcalinos y ácidos que rompan el complejo de celulosa, hemicelulosa y lignina (El Halal y col., 2015). Antes de la extracción de celulosa, algunos protocolos consideran el uso de solventes como el tolueno o el etanol para remover los lípidos y resinas; sin embargo, estudios sugieren que estos pretratamientos son innecesarios, ya que el hidróxido de sodio y el hipoclorito de sodio usados durante el proceso de extracción remueven los compuestos indeseados (Andreu-Hayles y col., 2019).

El método más común para disolver la lignina y la hemicelulosa es por medio de un tratamiento alcalino con hidróxido de sodio seguido de una etapa de blanqueamiento con hipoclorito de sodio. De igual manera, procesos mecánicos como homogeneización de alta presión, microfluidización, ultrasonificación, etc. son frecuentemente empleados para extraer celulosa. Además de estos tratamientos tradicionales de pulpeo se pueden utilizar métodos biológicos o enzimáticos, los cuales se basan en la habilidad de ciertos microorganismos y las enzimas que éstos secretan para atacar directamente la hemicelulosa y así facilitar su posterior remoción (Trache y col., 2017; Youssef y El-Sayed, 2018).

## 1.6 Nanocristales de celulosa

Las aplicaciones de la nanotecnología se han enfocado en la caracterización, fabricación y manipulación de nanomateriales, que son aquellos cuyas dimensiones se miden en escala nanométrica (Pathakoti y col., 2017). Estos materiales, comparados con los materiales de empaque convencionales, presentan una mejora en sus propiedades de barrera, mecánicas y termoestabilidad, además de ser biodegradables (Majid y col., 2018; He y col., 2019). Al combinar estructuras nanométricas con otros biopolímeros (polisacáridos o proteínas) se forman nanocompuestos, los cuales mejoran la eficacia de los materiales de empaque de alimentos (Bajpai y col., 2018; Sothornvit, 2019).

Los materiales nanocelulósicos han generado un gran interés debido a la posibilidad de producir materiales a partir de múltiples fuentes sustentables (Lindström, 2017). Existen dos tipos de nanocelulosa aislada de fibras de plantas: nanocristales y nanofibras. Los nanocristales son aislados por medio de la extracción de los dominios cristalinos a partir de materiales celulósicos, tienen una estructura rígida de forma fibrilar y el proceso principal para su obtención es por medio de tratamientos mecánicos e hidrólisis ácida utilizando ácido sulfúrico (Calvino y col., 2020).

La extracción de nanocristales de celulosa se puede realizar a través de distintos métodos como hidrólisis enzimática, que es un tratamiento biológico para la digestión de las fibras de celulosa por medio de enzimas (celulasa, endoglucanasa, celobiohidrolasa, etc.) que rompen los enlaces de hidrógeno entre las microfibras; otra forma de extracción es a través de tratamientos mecánicos como ultrasonificación, molienda de bolas u homogeneización a alta presión, entre otros. Sin embargo, para reducir el consumo de energía derivado de estos procesos mecánicos es recomendado llevar a cabo un pretratamiento como la hidrólisis ácida, en la cual, se utilizan ácidos como el sulfúrico, acético o fosfórico que hidrolizan las regiones amorfas de las fibras celulósicas permitiendo así que las regiones cristalinas formen una dispersión coloidal estable de nanocristales (Abdul Khalil y col., 2016; Sharma y col., 2019).

Los nanocristales, aún a bajas concentraciones, se pueden utilizar como un nanomaterial reforzante de una matriz polimérica, debido al tamaño nanométrico y a la mayor área superficial expuesta; además, de acuerdo a la literatura, las dimensiones nanométricas no son motivo para la pérdida de la biodegradabilidad del material (Mu y col., 2019). Es importante señalar que para obtener los nanocompuestos con las características fisicoquímicas deseadas, es necesario elaborar dispersiones homogéneas y que éstas presenten una buena interacción entre sus componentes (George y Sabapathi, 2015). Debido a las ventajas en cuanto a biodegradabilidad, bajo costo y propiedades mecánicas y físicoquímicas adecuadas, las películas desarrolladas a base de quitosano, celulosa y nanocristales de celulosa podrían ser utilizadas como un sustituto de materiales no sustentables como el plástico y el aluminio, utilizados en la envoltura y empaque de alimentos y otros productos (Ferrer y col., 2017).

#### 1.7 Plastificantes

Los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular altamente utilizados en la elaboración de las películas con la finalidad de mejorar sus propiedades mecánicas, de barrera y funcionales, ya que permiten reducir las interacciones entre las cadenas poliméricas de la matriz, lo cual les confiere una mayor flexibilidad y menor temperatura de transición vítrea (Vieira y col., 2011; Sabbah y col., 2019).

El plastificante que se incorpora a la matriz debe ser compatible con su estructura polimérica y tener una solubilidad similar en el solvente utilizado, para así optimizar las interacciones intermoleculares entre las cadenas poliméricas y el plastificante, las cuales se dan a través de enlaces de hidrógeno. Se ha reportado que los polioles como el glicerol, sorbitol, polietilenglicol, manitol y xilitol son particularmente eficientes en su uso como plastificantes (Sedayu y col., 2019). La naturaleza higroscópica del glicerol contribuye a que tenga un mayor efecto plastificante comparado con los otros plastificantes, debido a que este compuesto penetra a través de las cadenas poliméricas de la matriz, debilitando la interacción entre éstas y aumentando la flexibilidad y extensibilidad de las películas (Suderman y col., 2018).

## **2. HIPÓTESIS**

La combinación de celulosa y nanocristales de celulosa extraídos del olote de maíz (*Zea mays*, ssp. *mays*) y el biopolímero quitosano permitirá obtener películas biodegradables y compostables, con propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera mejoradas.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 Objetivo General

Elaborar y caracterizar películas a base de quitosano, celulosa y nanocristales de celulosa obtenida de olote de maíz (*Zea mays*, ssp. *mays*).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Extraer celulosa a partir de olote de maíz (*Zea mays*, ssp. *mays*).
- Obtener y evaluar nanocristales de celulosa a partir de maíz.
- Elaborar películas a base de quitosano, celulosa y nanocristales de celulosa de maíz.
- Determinar las propiedades mecánicas y de barrera de las películas elaboradas a partir de la celulosa y los nanocristales de celulosa, en mezcla con quitosano.
- Evaluar las interacciones de los nanocristales de celulosa con quitosano.
- Analizar el efecto de los nanocristales de celulosa en las propiedades fisicoquímicas de las películas.
- Evaluar la biodegradabilidad y compostabilidad de las películas elaboradas.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

Olote de maíz (*Zea mays*, ssp. *mays*) proveniente de Chilcuautla, Hidalgo, hidróxido de sodio (pellets, J.T. Baker, Edo. Méx., México), hipoclorito de sodio (5.38%, Cloralex, Monterrey, México), ácido sulfúrico (97.0%, J.T. Baker), ácido acético glacial (99.7%, J.T. Baker), quitosano (peso molecular medio, grado de desacetilación: 90%, Chemsavers, Bluefield, Virginia, EUA), glicerol (99.5%, J.T. Baker).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Extracción de celulosa

La extracción de celulosa de olote de maíz se realizó siguiendo la metodología de Melikoğlu y col. (2019) con algunas modificaciones (Figura 2). El olote se secó en un horno (Binder, Mod. WTB DB 115, Tuttlingen, Alemania) a 50 °C durante 24 h y fue molido en un molino de cuchillas (Fertimon, Mod. MO5.5HP, México); las partículas se molieron nuevamente en un molino eléctrico (Krupps, Mod. GX4100, Solingen, Alemania) para reducir el tamaño de partícula a alrededor de 2.83 mm (malla no. 7, Tyler Standard, Ohio, EUA) (Bono y col., 2009; Rodsamran y Sothornvit, 2015).



Figura 2. Secado y molienda del olote.

Se agregó 3.3 g del olote molido en 100 mL de una solución de NaOH al 10% (p/v), la mezcla se calentó a 55 °C durante 3 h con agitación constante en una parrilla de agitación (Barnstead Thermolyne, Dubuque, Iowa, EUA); el residuo insoluble se filtró y se lavó con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se secó en un horno

(Binder, Mod. WTB DB 115, Tuttlingen, Alemania) a 60 °C durante 24 h (Figura 3).



Figura 3. Diagrama general del tratamiento alcalino del olote.

Aunque la mayor parte de la lignina fue eliminada con el tratamiento alcalino, el resto de la lignina fue removida al colocar el residuo seco en una solución de NaClO al 1% (v/v) y calentarlo a 95 °C durante 1 h con agitación constante. Este paso se repitió dos veces; posteriormente, el residuo se filtró y se lavó con agua destilada hasta obtener un pH neutro y se secó en un horno a 60 °C durante 24 h (Figura 4).



Figura 4. Diagrama general de la etapa de blanqueamiento del olote.

#### 4.2.2 Producción de nanocristales de celulosa

Para la producción de nanocristales a partir de celulosa se siguió el método de hidrólisis ácida reportado por Melikoğlu y col. (2019) con algunas modificaciones (Figuras 5 y 6). Una muestra de 10 g de celulosa seca, previamente extraída, se agregó a una solución de 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 45% (v/v), la mezcla se calentó a 50 °C durante 45 minutos con agitación constante. Para detener la hidrólisis se añadió agua destilada helada en proporción 1:5 (suspensión:H<sub>2</sub>O, v/v) y la mezcla se agitó

sin calentamiento durante 10 minutos.

Posteriormente, se centrifugó a 4° C, 4000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga (Eppendorf, Mod. 5810 R, Hamburgo, Alemania) repitiendo este paso 4 veces para remover el ácido. El residuo insoluble resultante se diluyó con agua destilada y se dializó a temperatura ambiente durante 24 h en una bolsa de diálisis de punto de corte 12 kDa (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EUA). La suspensión de nanocristales se sonicó a 25 °C durante 10 minutos en un ultrasonicador (Branson, Mod. 5510, Danbury, Connecticut, EUA).



Figura 5. Diagrama general de la producción de nanocristales de celulosa (parte 1).

La solución resultante se mezcló utilizando un Ultra-Turrax (IKA, Mod. T25 Basic S1, Staufen, Alemania) a 9500 rpm durante 2 minutos y, finalmente, la suspensión se agregó a una solución de NaClO al 1% (v/v) y se mantuvo con agitación constante durante 1 h y se centrifugó (4° C, 4000 rpm, 5 minutos), repitiendo este paso 4 veces para obtener un pH neutro y se secó en un horno a 60 °C durante 24 h.



Figura 6. Diagrama general de la producción de nanocristales de celulosa (parte 2).

#### 4.2.3 Rendimiento de celulosa y de nanocristales de celulosa

Se calculó el porcentaje de rendimiento de la celulosa y de los nanocristales de celulosa extraídos utilizando la Ecuación 1:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{P_{C \text{ ó } NC}}{P_O} \times 100 \quad (1)$$

donde  $P_C$  es el peso de la celulosa (g),  $P_{NC}$  es el peso de los nanocristales de celulosa (g) y  $P_O$  es el peso del olote (g).

#### 4.2.4 Elaboración de películas de celulosa, nanocristales de celulosa y quitosano

Se prepararon tres diferentes tipos de películas por la técnica de vaciado en cajas Petri siguiendo la metodología de Salari y col. (2018) de acuerdo a las concentraciones mostradas en el Cuadro 1, las cuales se basaron en estudios reportados en la literatura (Escamilla-García, Reyes-Basurto, y col., 2017; Mujtaba y col., 2017; Tang y col., 2018; Claro y col., 2019).

Cuadro 1. Concentración de los diferentes componentes de cada película.

Película	Concentraciones % (p/ v)		
	Celulosa	Nanocristales de celulosa	Quitosano
C:Q	1.5	0	1
C:NC:Q	1.2	0.3	1
Q	0	0	1

C: Celulosa, NC: Nanocristales de celulosa, Q: Quitosano

La solución de quitosano (Q) fue preparada al disolver el polvo de quitosano en una solución de ácido acético al 0.5% (v/v) bajo agitación constante a 100 °C durante 1 h. La celulosa (C) y los nanocristales de celulosa (NC) fueron dispersados en una solución de ácido acético al 0.5% (v/v) bajo agitación constante durante 1 h (Figura 7a y 7b).

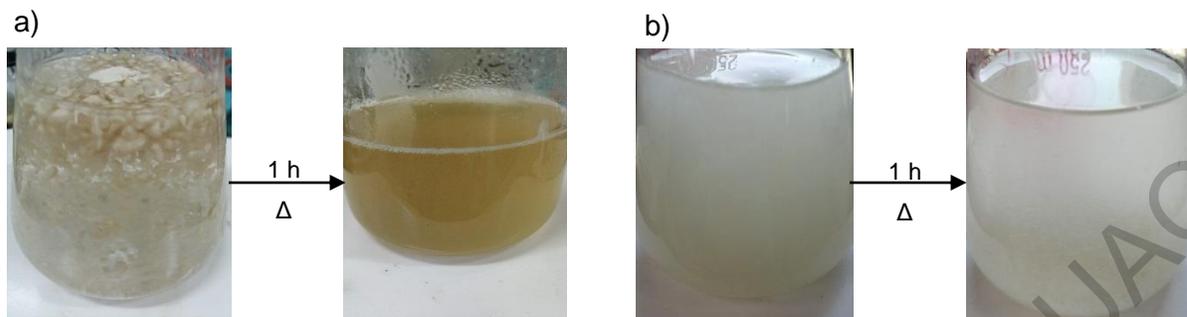


Figura 7. Preparación soluciones de a) quitosano, b) celulosa.

Posteriormente, la solución de Q fue añadida a las soluciones de C y de C:NC en proporción 1:1 (v/v) y como plastificante se agregó glicerol al 1% (p/v), el mezclado se realizó bajo agitación durante 90 minutos. Para una mejor homogeneización, las soluciones fueron tratadas con Ultra-Turrax (IKA, Mod. T25 Basic S1, Staufen,) a 9500 rpm durante 2 minutos y, finalmente, se vaciaron en cajas Petri y se secaron a 70 °C durante 24 horas (Figura 8). Debido a la insolubilidad en agua de la C y los NC, algunas propiedades físicoquímicas de las películas pueden verse afectadas.

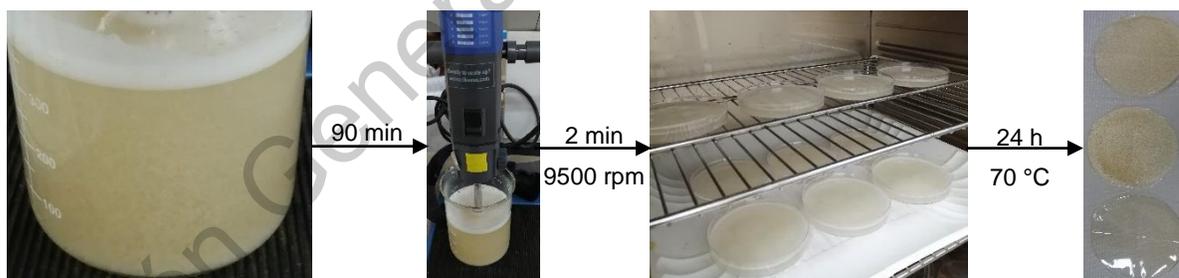


Figura 8. Diagrama general de la elaboración de las películas.

#### 4.2.5 Caracterización de las películas

##### 4.2.5.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad (CH) de las diferentes películas se determinó de acuerdo al método descrito por Gutiérrez (2018). El peso seco de las películas se obtuvo al cortar muestras de cada película en cuadros de 2 x 2 cm, calentarlas en un horno a 105 °C durante 24 h y pesando cada una en una balanza analítica (Sartorius, Mod.

BA 110 S, Bohemia, Nueva York, EUA). Para el peso húmedo se cortaron cuadros de 2 x 2 cm de cada película y se pesaron. El CH se calculó con la Ecuación 2:

$$\text{CH (\%)} = \frac{P_h - P_s}{P_h} \times 100 \quad (2)$$

donde  $P_h$  es el peso húmedo (g) y  $P_s$  es el peso seco (g).

#### 4.2.5.2 Solubilidad en agua

La solubilidad en agua (SA) se determinó de acuerdo al método descrito por (Gutiérrez, 2018) (Figura 9). Muestras de cada película se cortaron en cuadros de 2 x 2 cm y los pesos iniciales se registraron. El contenido inicial de materia seca de cada película ( $P_i$ ) se determinó al secar cada una de ellas en un horno a 105 °C durante 24 h, hasta peso constante. Para determinar el peso de la materia seca no solubilizada, los cuadros de la película se sumergieron en 50 mL de agua destilada y se almacenaron a 25 °C durante 24 h. Después de esto, se filtraron a través de un papel filtro previamente desecado y pesado, y las películas no disueltas se secaron a 105 °C durante 24 h hasta peso constante ( $P_f$ ). La solubilidad de cada película se calculó con la Ecuación 3:

$$\text{SA (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (3)$$

donde  $P_i$  y  $P_f$  son los pesos inicial y final de cada muestra (g), respectivamente.

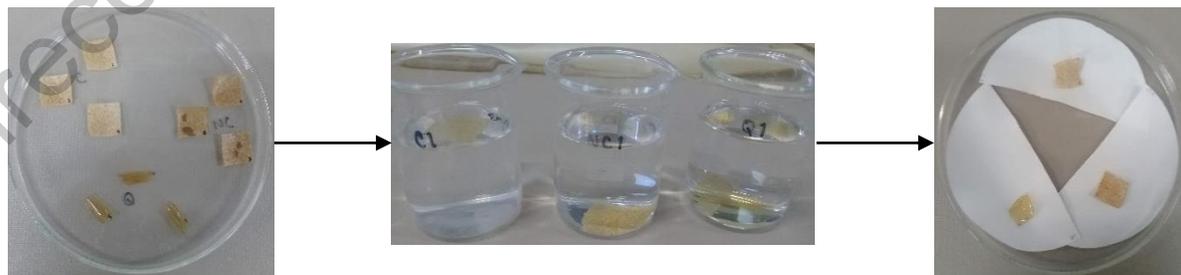


Figura 9. Diagrama general del análisis de solubilidad de las películas.

#### 4.2.5.3 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó siguiendo la metodología descrita por Escamilla-García y col. (2013). Para esta prueba se utilizaron celdas de permeabilidad con un diámetro interno de 3.2 cm, una altura de 15.3 cm entre la celda y la tapa del desecador ( $h_0$ ) y una altura de 8.2 cm entre la película y el contenido de la celda ( $h_i$ ) (Figura 10).

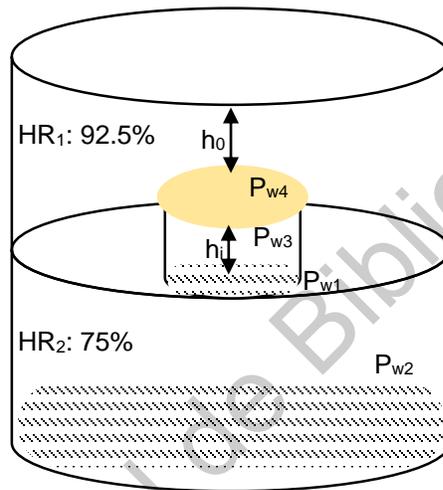


Figura 10. Diagrama de la permeabilidad al vapor de agua.

Dentro de las celdas se colocó una solución saturada de  $KNO_3$  ( $HR = 92.5\%$ , a  $T = 25^\circ C$ ), posteriormente se recortaron las películas en una forma circular ( $\Phi = 4$  cm) y se colocaron en la superficie de la celda. Finalmente, las celdas de permeabilidad se colocaron en un desecador el cual contenía una solución saturada de  $NaCl$  ( $HR = 75\%$ ,  $T = 25^\circ C$ ) y se registraron las variaciones de peso de las celdas de permeabilidad hasta llegar a peso constante, la permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtuvo a partir de la Ecuación 4:

$$PVA = \frac{\Delta W}{tA} * \frac{L}{\Delta P} \quad (4)$$

donde  $\Delta W$  es la variación del peso de la celda de permeabilidad (g),  $t$  es el tiempo

que dura la prueba (s), A es el área de contacto de la película comestible (m<sup>2</sup>), L es el espesor de la película (mm) y ΔP es la diferencia de presiones (Pa).

Una vez calculada la PVA, este valor se corrigió por medio de las metodologías reportadas por Gennadios y col. (1994):

$$P_{w1} = P_0 * \frac{HR_1}{100} \quad (5)$$

$$P_{w2} = P_0 * \frac{HR_2}{100} \quad (6)$$

$$P_{w3} = P_T - (P_T - P_{w1}) * \frac{PVA * R * T * h_1}{P_T * D} \quad (7)$$

$$P_{w4} = P_T - (P_T - P_{w2}) * \frac{PVA * R * T * h_0}{P_T * D} \quad (8)$$

$$Perm_C = Permeancia_m * \frac{P_{w1} - P_{w2}}{P_{w3} - P_{w4}} \quad (9)$$

$$PVA_C = Perm_C * \frac{L}{P_{w1} - P_{w2}} \quad (10)$$

donde P<sub>w1</sub> es la presión parcial dentro de la celda de permeabilidad, P<sub>w2</sub> es la presión parcial dentro del desecador, P<sub>w3</sub> y P<sub>w4</sub> son la presión debajo y sobre la película, respectivamente, D es la difusividad del vapor de agua a través del aire (2.81956 m<sup>2</sup>/día, 25°C), R es la constante de los gases (8.314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), T es la temperatura a la cual se realiza el experimento (298 K), P<sub>T</sub> es la presión atmosférica (82 kPa en Querétaro), P<sub>0</sub> es la presión del vapor de agua a la temperatura de la prueba (3.167 kPa) y Permeancia experimental (Permeancia<sub>m</sub>) es la pendiente de la curva de variación de peso contra tiempo.

#### 4.2.5.4 Determinación del espesor

El espesor de las películas se midió con un micrómetro (Mitutoyo, Mod. 293-344-30, Illinois, EUA) (Figura 11) en diez posiciones aleatorias diferentes a lo largo de la superficie de las películas. Los valores se reportaron como la media ± la desviación estándar de tres replicados.



Figura 11. Medición del espesor de las películas.

#### 4.2.5.5 Propiedades mecánicas

La resistencia a la tensión en el punto de quiebre (RT) fue medida con un texturómetro (Brookfield, Mod. CT3, Middleborough, Massachusetts, EUA) (Figura 12) y el programa TexturePro CT 1.6 (Brookfield). Las películas fueron cortadas en rectángulos de 80 x 25 mm los cuales se colocaron entre dos abrazaderas, con una separación inicial de agarre de 97.9 mm. Se estableció una carga de activación de 4 N y las películas fueron distendidas a una velocidad de 0.3 mm/seg. La RT fue calculada al dividir la carga máxima (N) entre el área transversal (m<sup>2</sup>) de acuerdo con la Ecuación 11 (Nur Hazirah y col., 2016).

$$RT \text{ (MPa)} = \frac{C}{(A \times E)} \quad (11)$$

donde  $C$  es la carga máxima (N),  $A$  es el ancho de la muestra (mm) y  $E$  es el espesor de la película (mm).



Figura 12. Análisis de RT de las películas.

#### 4.2.5.6 Color

Los siguientes parámetros de color de las películas  $L^*$  (donde  $L^* = 0$  indica negro y  $L^* = 100$  indica blanco),  $\pm a^*$  (rojo a verde),  $\pm b^*$  (amarillo a azul), fueron evaluados utilizando un colorímetro (Konica Minolta, Mod. CR-400, Ramsey, Nueva Jersey, EUA) con una fuente de iluminación D65 en ángulo de visión de  $10^\circ$ , estandarizado con una placa blanca de referencia ( $L^* = 90.9$ ,  $a^* = 0.021$  y  $b^* = 0.0376$ ). Las películas fueron colocadas en esta placa y las mediciones se realizaron en cinco posiciones diferentes a lo largo de su superficie (centro y partes externas) evitando los bordes. Las diferencias de color ( $\Delta E$ ), medidas como la magnitud del vector resultante de los tres componentes: diferencia de luminosidad ( $\Delta L$ ), diferencia de cromaticidad rojo-verde ( $\Delta a$ ) y la diferencia de cromaticidad amarillo-azul ( $\Delta b$ ), fueron calculadas siguiendo la Ecuación 12 (Gutiérrez y col., 2015):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2} \quad (12)$$

donde  $\Delta a = a_i - a$ ,  $\Delta b = b_i - b$  y  $\Delta L = L_i - L$ . El subíndice  $i$  es el valor de referencia de cada parámetro.

#### 4.2.5.7 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Las características topográficas de las películas se determinaron utilizando un microscopio de fuerza atómica (Veeco, Mod. diMultimode V, Santa Bárbara, California, EUA), aplicando el método de contacto y utilizando puntas de Si (Cantiléver RTE SP, Bruker, EUA) con una frecuencia de resonancia de 286-362 kHz y una constante de resorte de  $20-80 \text{ N m}^{-1}$ . Se analizaron muestras de  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}$  y tres áreas de  $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}$  fueron escaneadas a una velocidad de 1 Hz con una resolución de  $256 \times 256$  pixeles (Escamilla-García y col., 2017). El análisis de las imágenes y los parámetros de rugosidad  $R_a$  y  $R_q$  se obtuvieron utilizando el programa Gwyddion 2.54 (Czech Metrology Institute, República Checa).

#### 4.2.5.8 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro IR<sup>2</sup> Module (Horiba Jobin Yvon, Kioto, JPN) equipado con un objetivo ATR de diamante, a una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, un rango de 400 – 4000 cm<sup>-1</sup> y haciendo 32 escaneos por lectura. Los espectros se analizaron a través del programa Spectragryph 1.1 (Spectroscopy Ninja, EUA).

#### 4.2.5.9 Biodegradabilidad de las películas

Se evaluó la biodegradabilidad de las películas siguiendo el método de ASTM G21-09 (ver Anexo A.1), el cual se ha aceptado como una prueba estandarizada para evaluar la biodegradabilidad de materiales, utilizando cinco hongos que tuvieron a las películas como sustrato: *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* y *Aureobasidium pullulans* fueron utilizados al incubar los subcultivos a 30 °C durante 20 días en un agar enriquecido con sales (la composición por litro de este medio fue: 15 g de agar, 0.7 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.7 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.7 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.005 g de NaCl, 0.002 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.002 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0.001 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O).

Una vez que los hongos esporularon, suspensiones individuales de esporas se prepararon al verter 10 mL de una solución acuosa estéril de Tween 80 (0.05 g/L) en cada subcultivo, se raspó su superficie y se vació la carga de esporas en un matraz con 45 mL de H<sub>2</sub>O estéril. Las esporas se lavaron tres veces y se diluyeron con una solución estéril enriquecida con sales hasta obtener una suspensión de  $1 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$  esporas/mL (determinada en un microscopio óptico con una cámara Neubauer) y finalmente se mezclaron volúmenes iguales de cada suspensión para obtener una mezcla de esporas.

Se colocaron cuadros de película de 2.5 x 2.5 cm en cajas Petri que contenían agar enriquecido con sales. La superficie de las películas fue inoculada con 1 mL de la mezcla de esporas. Las cajas se incubaron a 30 °C y 85 % HR durante 28 días; durante este periodo se realizó una inspección visual del crecimiento de los hongos

y en el día 28 se otorgó una calificación de acuerdo al Cuadro 2. Como control positivo se utilizaron cuadros de papel filtro y como control adicional se incluyó la evaluación de la biodegradabilidad de cuadros de película sin la mezcla de esporas.

Cuadro 2. Escala para la evaluación del crecimiento de hongos durante la prueba de biodegradabilidad.

Observación del crecimiento *	Escala
Ninguno	0
Trazas de crecimiento (<10 %)	1
Crecimiento ligero (10 – 30 %)	2
Crecimiento mediano (30 – 60 %)	3
Crecimiento abundante (60 % - completamente cubierto)	4

\* Corresponde al porcentaje de superficie de película cubierta por los hongos.

#### 4.2.5.10 Compostabilidad de las películas

La compostabilidad de las películas se evaluó utilizando el método descrito por Gutiérrez (2018) con algunas modificaciones. Discos de 0.6 cm de diámetro de cada película fueron cortados, el contenido inicial de materia seca de cada uno ( $P_i$ ) se determinó al secar los discos en un horno a 105 °C durante 24 h, hasta peso constante.

Se preparó composta vegetal y se colocó en contenedores, posteriormente los discos fueron enterrados a una profundidad de 10 mm aproximadamente (en cada contenedor se enterraron cuatro discos de películas: C:Q, C:NC:Q, Q y PF) (Figura 13). En los días 4, 8 y 12 después del día de inicio (día 0), donde fue posible, el contenido final de materia seca de cada disco fue obtenido ( $P_f$ ). Las pruebas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y condiciones de humedad (60 – 70 %).

El porcentaje de compostabilidad se calculó utilizando la Ecuación 13:

$$\text{Compostabilidad (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (13)$$

donde  $P_i$  y  $P_f$  son los pesos inicial y final de cada disco (g), respectivamente.



Figura 13. Ensayo de compostabilidad.

#### 4.2.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Los datos se sometieron a análisis de varianza de un factor y se analizaron por comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) utilizando el programa SigmaPlot 14.0 (Systat, Chicago, Illinois, EUA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Extracción de celulosa y de nanocristales de celulosa

En la Figura 14 se observan las características físicas del olote (O) al ser sometido a los diferentes tratamientos hasta obtener los nanocristales de celulosa (NC). Después de la molienda, el tratamiento alcalino redujo considerablemente el contenido de materia en un  $72.60 \pm 1.98 \%$  y volvió amarillento al producto; con el hipoclorito de sodio nuevamente hubo una reducción del contenido de materia (en un  $24.89 \pm 4.38 \%$ ), pero las fibras se volvieron blancas. Al terminar con la hidrólisis ácida la solución de NC tenía una apariencia oscura, pero al agregar otra vez hipoclorito de sodio, los NC obtenidos se blanquearon.

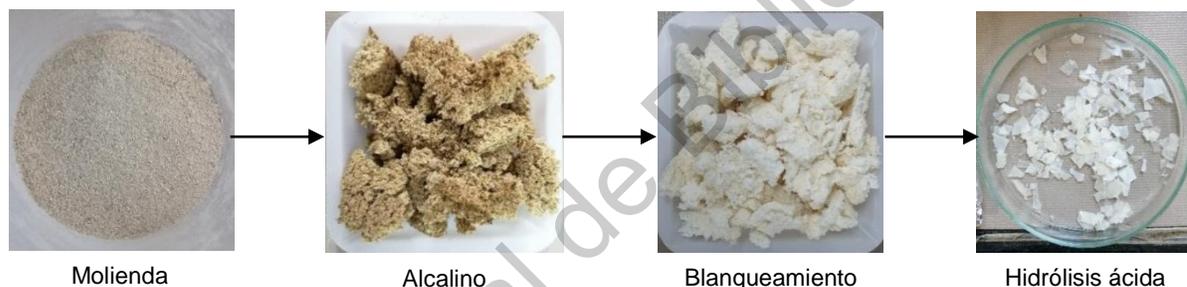


Figura 14. Tratamientos aplicados al olote para la obtención de nanocristales de celulosa.

### 5.2 Rendimiento de celulosa y nanocristales de celulosa

Los rendimientos que se muestran en el Cuadro 3 corresponden a la extracción de C y NC a partir del O. Estos resultados mostraron que la C obtenida fue alrededor de una quinta parte de la composición del O, ya que de los 55 g iniciales de materia se obtuvieron  $11.30 \pm 1.30$  g de celulosa; por otro lado, a partir de estos 11.30 g de C se extrajeron  $2.63 \pm 0.39$  g de NC con lo que se infiere que la hidrólisis ácida reduce a una cuarta parte la materia presente en la C.

Cuadro 3. Rendimiento de la extracción de celulosa y nanocristales de celulosa a partir del olote.

Muestra	Rendimiento (%)
C-O	21.28 ± 1.31
NC-O	5.70 ± 1.71

Los resultados de reportan como la media ± la desviación estándar. C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, O = Olote.

### 5.3 Elaboración de películas de celulosa, nanocristales de celulosa y quitosano

Las concentraciones elegidas para las películas de C y NC se basaron en estudios que demostraron que la elaboración de suspensiones de fibras naturales: nanocristales de celulosa en proporciones alrededor de 80:20 (% p/p), producen películas con propiedades físicoquímicas mejoradas (Claro y col., 2019). Por otro lado, una concentración de 30 % (p/p) de NC con respecto al peso seco del quitosano en la suspensión filmogénica mejora las propiedades mecánicas de las películas resultantes (Mujtaba y col., 2017). En otro estudio se observó que utilizando una relación 1:1 de quitosano:glicerol se obtienen películas con adecuadas propiedades físicoquímicas (Escamilla-García, Reyes-Basurto, y col., 2017).

Como se puede observar en la Figura 15, las películas de cada formulación mostraron diferencias en su aspecto. Las de C:Q mostraron una mayor homogeneidad comparadas con las de C:NC:Q, las cuales presentaron en ciertas zonas una aglomeración de partículas, lo cual dio a estas películas una heterogeneidad no deseada. Por otra parte, las películas de Q eran transparentes y ligeramente amarillentas en la periferia (parámetro no determinado cuantitativamente), a diferencia de las de C:Q y C:NC:Q que eran opacas y presentaban uniformemente un color amarillo. Todas las películas resultaron flexibles y fáciles de manipular.

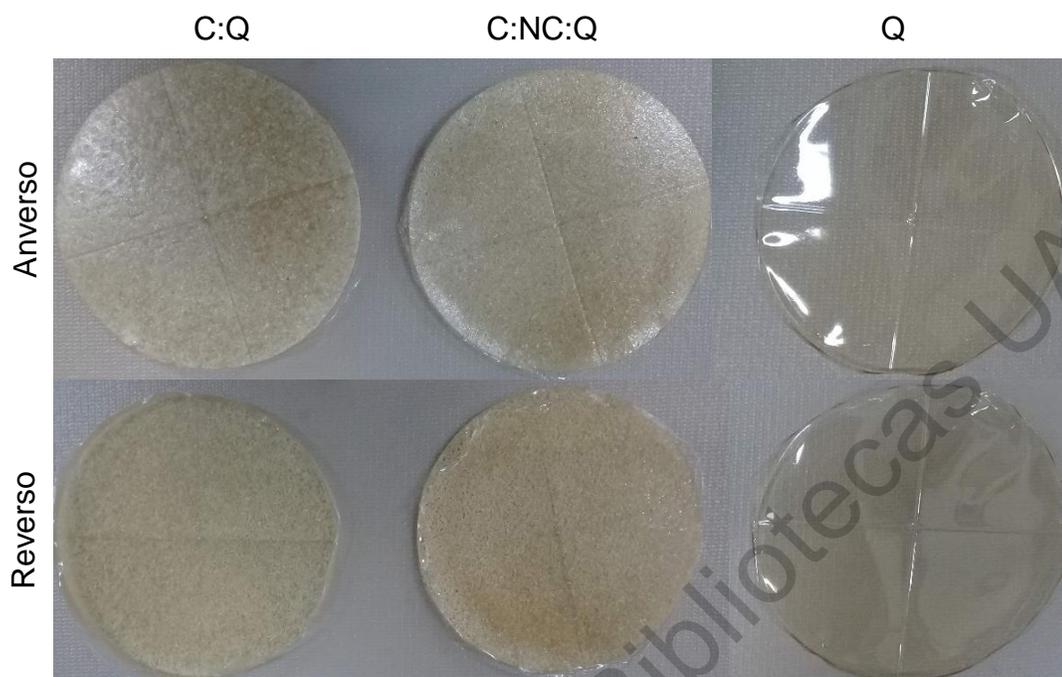


Figura 15. Apariencia de las películas elaboradas, se muestran por ambas caras.  
C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano.

#### 5.4 Caracterización de las películas

##### 5.4.1 Propiedades físicas de películas biodegradables.

El contenido de humedad (CH) en las tres películas elaboradas presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ellas, como se muestra en el Cuadro 4. De los resultados obtenidos se observa que la película con mayor CH es la elaborada a partir de Q ( $33.35 \pm 1.20$  %); sin embargo, al adicionar tanto C como NC, este parámetro disminuyó ( $20.07 \pm 1.02$  % y  $17.19 \pm 1.11$  %, respectivamente). Los valores de la solubilidad en agua (SA) de las películas de C:Q y C:NC:Q no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) entre ellos (Cuadro 4), pero sí hubo un incremento significativo en la SA de la película de Q ( $35.73 \pm 6.27$  %) con respecto a las otras dos películas,  $17.44 \pm 0.57$  % para C y  $19.80 \pm 1.62$  % para NC. Las muestras de las películas que contenían NC no mostraron cambios físicos al transcurrir 24 h sumergidas en agua, a diferencia de aquellas de C:Q y Q que sí presentaron diferencias en su coloración (Figura 16a y 16b).

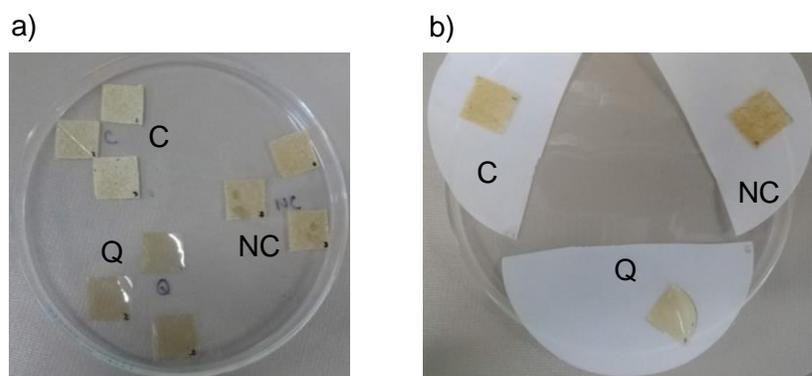


Figura 16. Apariencia de las películas a) antes y b) después de sumergirse durante 24 h en agua. C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano.

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas elaboradas muestran que la película de C:Q presentó el valor más alto ( $1.57 \pm 0.10 \times 10^{-12} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ), mientras que la película de Q tuvo el valor más bajo ( $0.78 \pm 0.20 \times 10^{-12} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ); además, cabe resaltar que la incorporación de los NC a la formulación de la película mejoró sus propiedades de barrera al disminuir el valor de PVA con respecto a la de C:Q (Cuadro 4). Entre los valores de PVA de las tres películas se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 4. Contenido de humedad (CH), Solubilidad en agua (SA) y Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las diferentes películas evaluadas.

Película	CH (%)	SA (%)	PVA $\times 10^{12} (\text{g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1})$
C:Q	$20.07 \pm 1.02^a$	$17.44 \pm 0.57^a$	$1.57 \pm 0.10^a$
C:NC:Q	$17.19 \pm 1.11^b$	$19.80 \pm 1.62^a$	$1.05 \pm 0.15^b$
Q	$33.35 \pm 1.20^c$	$35.73 \pm 6.27^b$	$0.78 \pm 0.20^c$

Los resultados se reportan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano.

#### 5.4.2 Espesor y Resistencia a la tensión

Los valores de espesor (E) y resistencia a la tensión (RT) se presentan en el Cuadro 5. La película con menor espesor fue la elaborada con Q ( $474.97 \pm 46.27 \mu\text{m}$ ) y al

adicionar C y NC, el espesor de éstas aumenta significativamente ( $615.93 \pm 30.03 \mu\text{m}$  y  $632.70 \pm 15.41 \mu\text{m}$ , respectivamente). Las películas C:Q y C:NC:Q no presentaron espesores significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Los valores de resistencia a la tensión (RT) de las tres películas no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellos, lo que significa que estas películas resisten la misma fuerza antes de romperse. La película con el valor más alto de RT fue la elaborada con Q ( $1.09 \pm 0.25 \text{ MPa}$ ).

Cuadro 5. Espesor (E) y Resistencia a la tensión (RT) de las diferentes películas.

Película	E ( $\mu\text{m}$ )	RT (MPa)
C:Q	$615.93 \pm 30.03^a$	$0.79 \pm 0.23^a$
C:NC:Q	$632.70 \pm 15.41^a$	$0.84 \pm 0.13^a$
Q	$474.97 \pm 46.27^b$	$1.09 \pm 0.25^a$

Los resultados se reportan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano.

#### 5.4.3 Color

En el Cuadro 6 se presentan los parámetros de color  $a^*$  (valor cromático de rojo a verde),  $b^*$  (valor cromático de amarillo a azul),  $L^*$  (luminosidad) y  $\Delta E$  (diferencia de color total) obtenidos de las películas elaboradas. De los valores presentados se puede observar que todas las películas tuvieron valores negativos para el parámetro  $a^*$  y que la película C:Q mostró una tendencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) hacia los valores negativos ( $-1.88 \pm 0.02$ ) con respecto a las de C:NC:Q y Q ( $-0.95 \pm 0.02$  y  $-0.96 \pm 0.00$ , respectivamente) que no presentaron valores significativamente diferentes entre ambas ( $p > 0.05$ ). Todas las películas presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el parámetro  $b^*$ ; sin embargo, la película de Q fue la que tuvo un valor menor ( $7.42 \pm 0.01$ ).

Dentro del parámetro de luminosidad ( $L^*$ ) las tres películas elaboradas tuvieron diferencias significativas en sus valores ( $p < 0.05$ ) y se puede observar que la adición

de la C y los NC disminuyó este valor al compararlo con el de la película de Q. Las más grandes diferencias en el color ( $\Delta E$ ) de las películas se presentaron en las de C:Q y C:NC:Q con respecto a la de Q, aunque las tres fueron diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 6. Parámetros de color: valor cromático ( $a^*$  y  $b^*$ ), luminosidad ( $L^*$ ) y diferencia de color ( $\Delta E$ ) de las películas evaluadas.

Película	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$\Delta E$
C:Q	$-1.88 \pm 0.02^a$	$19.09 \pm 0.01^a$	$87.67 \pm 0.17^a$	$19.42 \pm 0.04^a$
C:NC:Q	$-0.95 \pm 0.02^b$	$19.18 \pm 0.02^b$	$89.80 \pm 0.66^b$	$19.21 \pm 0.04^b$
Q	$-0.96 \pm 0.00^b$	$7.42 \pm 0.01^c$	$97.69 \pm 0.04^c$	$10.08 \pm 0.03^c$

Los resultados se reportan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano.

#### 5.4.4 Características topográficas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Los parámetros de rugosidad  $R_a$  y  $R_q$  se presentan en el Cuadro 7, donde se observa que la película de Q presentó el valor más bajo de rugosidad ( $R_a$ :  $0.95 \pm 0.09$  nm y  $R_q$ :  $1.20 \pm 0.07$  nm), aunque no se observó una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto a la película de C:Q en los valores de  $R_a$  ( $1.80 \pm 0.31$  nm) y  $R_q$  ( $2.23 \pm 0.35$  nm). La película con los NC presentó los valores de rugosidad más altos ( $R_a$ :  $3.97 \pm 0.85$  nm y  $R_q$ :  $4.90 \pm 0.98$  nm) y estos fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al compararlos con los obtenidos en las otras dos películas.

Cuadro 7. Parámetros de rugosidad ( $R_a$  y  $R_q$ ) de las películas evaluadas.

Película	$R_a$ (nm)	$R_q$ (nm)
C:Q	$1.80 \pm 0.31^a$	$2.23 \pm 0.35^a$
C:NC:Q	$3.97 \pm 0.85^b$	$4.90 \pm 0.98^b$
Q	$0.95 \pm 0.09^a$	$1.20 \pm 0.07^a$

Los resultados se reportan como la media  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano.

En la Figura 17 se observan las micrografías de las películas en un área de  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$  y se presenta una escala de color dorado degradado que implica la altura (color más claro mayor altura), con esto se puede mostrar que entre mayor gama de tonalidades doradas se presente en la micrografía, menor uniformidad tiene la superficie de la muestra. La película de Q (Figura 17c) fue la que presentó la superficie más lisa ya que la tonalidad que se aprecia es en su mayoría oscura, mientras que en las películas de C:Q (Figura 17a) y C:NC:Q (Figura 17b) se observaron diferentes tonalidades en sus superficies, lo cual coincide con los valores mayores de rugosidad presentados en el Cuadro 7 .

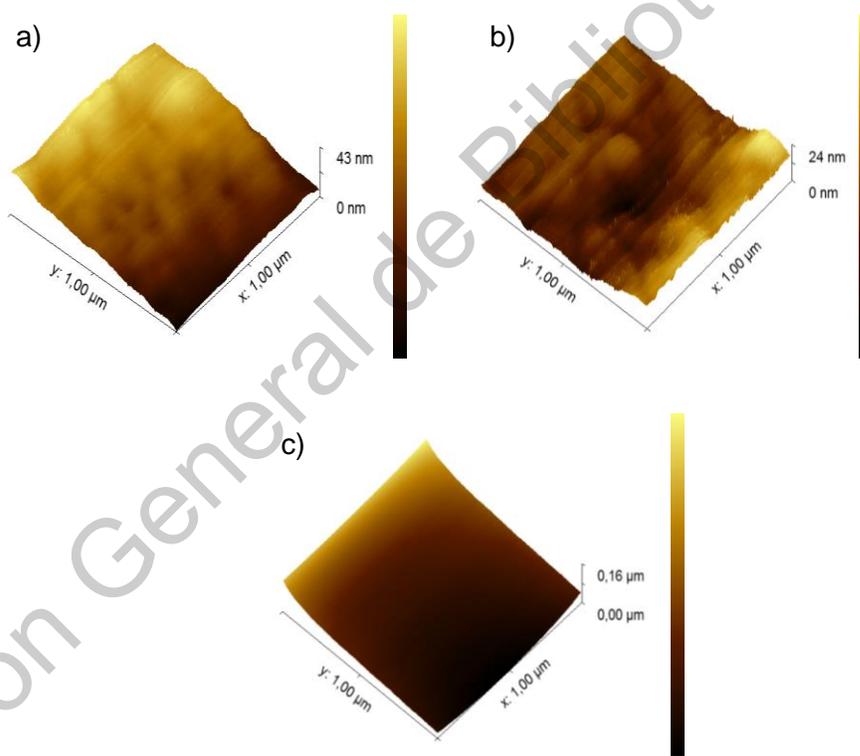


Figura 17. Micrografías de las películas ( $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ ) de a) celulosa, b) nanocristales de celulosa y c) quitosano.

#### 5.4.5 Espectroscopía FTIR

En la Figura 18a se muestra el espectro de FTIR de la celulosa extraída del olote y se pueden apreciar los picos característicos de este polímero: una banda en 3313

$\text{cm}^{-1}$  de la vibración de tensión O-H, una banda por vibración de tensión -C-H localizada en  $2933 \text{ cm}^{-1}$ , en  $1639 \text{ cm}^{-1}$  una banda por el enlace O-H del agua absorbida, la banda que corresponde al -CH<sub>2</sub> del tijereteo está en  $1422 \text{ cm}^{-1}$ , una banda en  $1319 \text{ cm}^{-1}$  de aleteo -CH<sub>2</sub>, la banda de la vibración de tensión del anillo de piranosa C-O-C en  $1031 \text{ cm}^{-1}$  (Bonardd y col., 2018; Galiwango y col., 2019). Los picos observados alrededor de esta última banda ( $1160$  y  $940 \text{ cm}^{-1}$ ) se atribuyen a los grupos arilo presentes en las fracciones residuales de lignina (Evans y col., 2019).

En las Figuras 18b y 18c se observan los espectros FTIR de las películas de quitosano a las que se les añadió celulosa y nanocristales de celulosa, respectivamente. Los picos característicos del quitosano se encuentran en  $1648$ , alrededor de  $1550$  y en  $1411 \text{ cm}^{-1}$  y corresponden al estiramiento de C=O (amida I), a la flexión N-H (amida II) y al estiramiento de HN-CO (amida III), respectivamente. El pico de absorción en  $1030 \text{ cm}^{-1}$  es debido al estiramiento de C-O; los dos picos en  $2920$  y  $2850 \text{ cm}^{-1}$  están relacionados con el grupo amino y picos en el rango de  $3600$  a  $3200 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a bandas de estiramiento O-H y N-H. Es bien sabido que las bandas de absorción características de los NC aparecen en  $3000$  a  $2800 \text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-H de grupos CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>) y en  $3455$  a  $3230 \text{ cm}^{-1}$  (estiramiento O-H) (Salari y col., 2018; Valizadeh y col., 2019).

#### 5.4.6 Ensayo de biodegradabilidad

En la Figura 19 se observa que al transcurrir los 28 días del ensayo de biodegradabilidad, hubo un gran crecimiento de los hongos en la película de C:Q (Figura 19a) y en el control positivo (Figura 19d), por lo que ambas películas se señalaron con el número 4, lo cual significa cobertura completa. La película con NC (Figura 19b) se marcó con el número 3 porque presentó sólo alrededor del 50 % de su superficie cubierta por hongos, y la película con menor crecimiento fue la de Q (Figura 19c), marcada con 1.

Además del crecimiento fúngico otro cambio físico observado a lo largo del ensayo fue el color de las películas; en el caso de las de C:Q y C:NC:Q, estas pasaron de

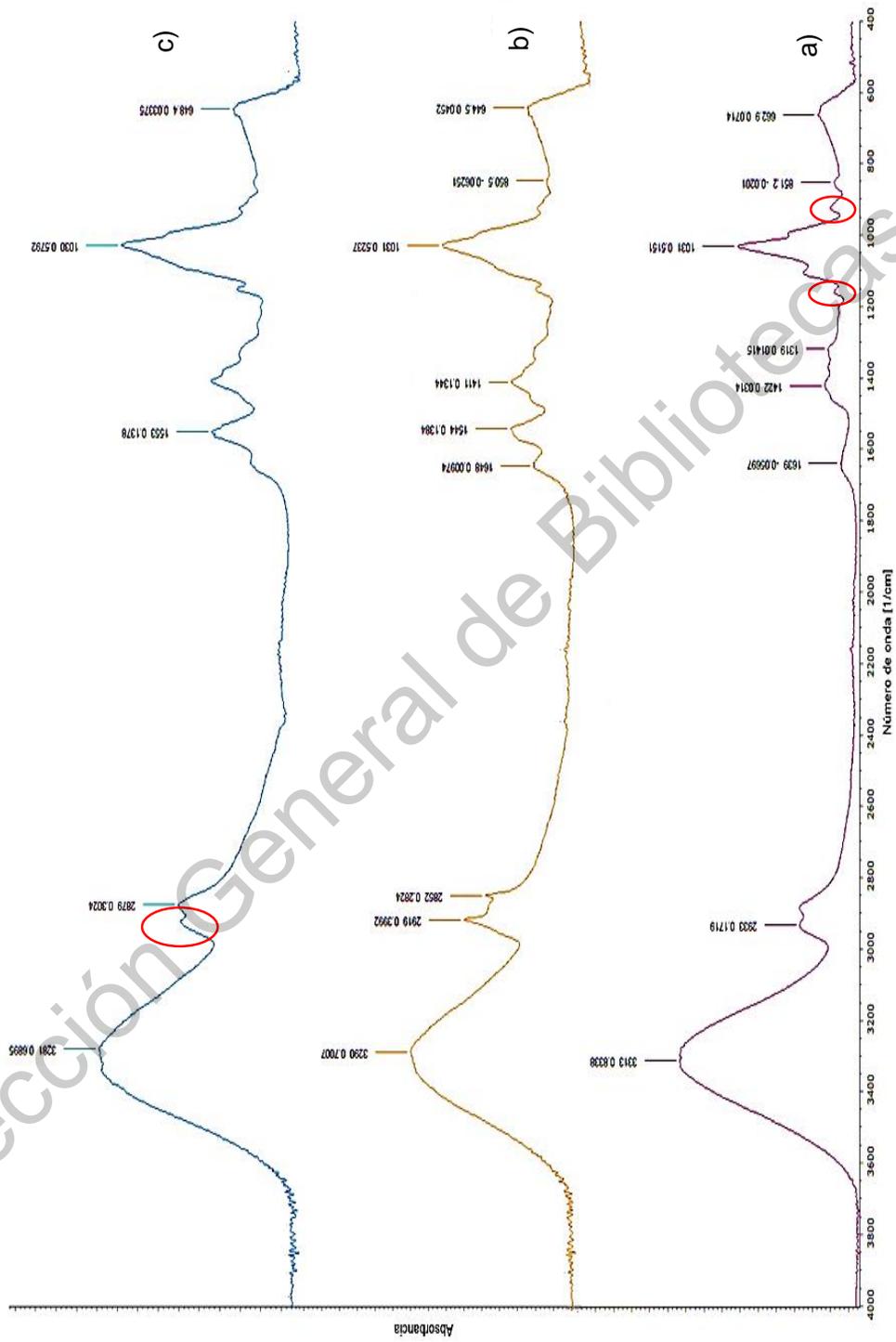


Figura 18. Espectrogramas IR de a) celulosa, b) película C:Q y c) C:NC:Q.  
 C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano

amarillo a marrón oscuro; la de Q que en un inicio era casi incolora, en el día 28 presentaba una coloración amarilla. El control negativo, que eran películas sin suspensión de esporas, (Figura 19e) del papel filtro al final del ensayo presentó un ligero crecimiento blanco con apariencia algodonosa y las películas de C:Q y C:NC:Q tuvieron un oscurecimiento en su periferia.

La progresión a lo largo de los días del ensayo de la biodegradabilidad de las películas se muestra en la Figura 20 del Anexo A.2. En el caso del papel filtro (Figura 20d), desde el día 10 ya se observaba una amplia cobertura de esporas sobre su superficie; mientras que para la película de C:Q (Figura 20a) no fue sino hasta el día 20 que los hongos la cubrieron; el crecimiento fúngico en la película C:NC:Q (Figura 20b) comenzó el día 20 y en la película de Q (Figura 20c) no se visualizaron esporas sobre su superficie sino hasta el día final del ensayo.

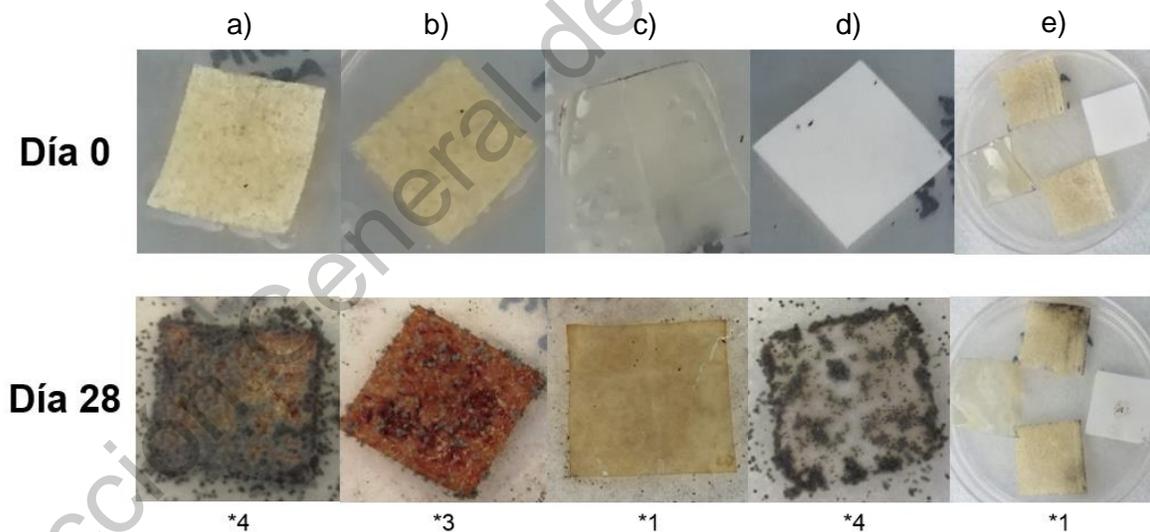


Figura 19. Biodegradabilidad de las películas de a) celulosa, b) nanocrisales de celulosa, c) quitosano y d) papel filtro observada en el día 0 y día 28 después de la inoculación de la mezcla de esporas. Como control negativo se colocaron e) películas en medio sin inocular. Los números abajo de cada imagen corresponden a la escala de crecimiento descrita en el Cuadro 2.

#### 5.4.7 Compostabilidad de las películas

El porcentaje de compostabilidad de las tres películas con respecto al control (papel filtro) fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ), pero los valores entre ellas no tuvieron una variación significativa ( $p > 0.05$ ), tal como se observa en el Cuadro 8. Después de 4 días de compostaje las muestras de las películas empezaron a cambiar de color, volviéndose más oscuras; además que para el día 12 aumentaron su fragilidad.

Se reportó una compostabilidad del 100% para el PF debido a que en la última medición no se pudo recuperar material para pesar, ya que al intentar tomar el círculo de la muestra ésta se desintegraba, haciendo imposible su manipulación para el registro de su peso final.

Cuadro 8. Porcentaje de compostabilidad de las diferentes películas evaluadas.

Película	Compostabilidad (%)
C:Q	37.35 ± 1.88 <sup>a</sup>
C:NC:Q	43.75 ± 7.18 <sup>a</sup>
Q	40.79 ± 19.36 <sup>a</sup>
PF	100.00 ± 0.00 <sup>b</sup>

Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa,  
Q = Quitosano, PF = Papel filtro

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Extracción de celulosa y de nanocristales de celulosa

Para la extracción de los nanocristales de celulosa (NC) se requieren de dos pasos principales: la purificación de la celulosa (C) y la separación de los NC. El método más utilizado para disolver la lignina y la hemicelulosa que rodean las fibras de C es el tratamiento alcalino en el cual las fibras naturales se tratan con una solución acuosa de concentración conocida de hidróxido de sodio a una temperatura y tiempo establecidos, hasta que las fibras se vuelven amarillentas. La función de este tratamiento es modificar la superficie externa de la pared celular de las fibras al remover de ella impurezas (grasas, ceras, pectina) y componentes no celulósicos como la lignina y hemicelulosa, que son solubles en soluciones alcalinas y que al ser menos densos pueden ser separados fácilmente con una posterior centrifugación (Ouarhim y col., 2019).

La modificación que lleva a cabo el tratamiento alcalino es la alteración del enlace OH en la red estructural de las fibras al ionizar los grupos hidroxilos de los componentes no celulósicos hasta convertirlos en alcóxidos [Fibra-OH + NaOH → Fibra-O-Na<sup>+</sup> (alcóxido) +H<sub>2</sub>O], de este modo se da una separación de las regiones interfibrilares de las fibras de C y la solubilización, para su posterior remoción, de la lignina y la hemicelulosa. Debido a este proceso de purificación, la alcalinización de los materiales celulósicos aumenta la cristalinidad de sus fibras (Ng y col., 2015).

Después del tratamiento alcalino, el blanqueamiento es un paso necesario para remover los materiales residuales (en su mayoría lignina) de las fibras, proceso conocido como deslignificación. El objetivo del blanqueamiento es degradar los grupos cromóforos (al oxidar el anillo aromático) presentes en la lignina y eliminar los subproductos resultantes de esta degradación, para así blanquear el material. Este proceso generalmente se lleva a cabo sometiendo a las fibras de C a un tratamiento con una solución acuosa de hipoclorito de sodio, bajo calentamiento y se puede repetir las veces necesarias hasta que las fibras se vuelvan completamente blancas

(Trache y col., 2017).

Una insuficiente remoción de lignina por un blanqueamiento deficiente podría causar una menor eficiencia en la posterior hidrólisis ácida para la obtención de NC, debido a que una cantidad significativa de residuos no celulósicos podría impedir la acción del ácido en las fibras de C, afectando la pureza y cristalinidad de los NC (Ng y col., 2015). Las microfibras de C puras obtenidas de los tratamientos anteriores, tienen una estructura altamente ordenada y regiones cristalinas con algunas zonas desordenadas (amorfos). Cuando estas microfibras se someten a tratamientos químicos y mecánicos, las regiones cristalinas pueden ser extraídas, resultando en la formación de NC, los cuales son partículas rígidas con forma fibrilar que comparados con las fibras de celulosa, que poseen una mayor cantidad de fracciones amorfas, estos NC exhiben una fuerza específica, mayor área de contacto y propiedades cristalinas únicas (George y Sabapathi, 2015).

El tratamiento químico comúnmente utilizado es la hidrólisis ácida, que se lleva a cabo al mezclar la C pura con una solución acuosa de un ácido fuerte (generalmente ácido sulfúrico), para remover los dominios amorfos que están distribuidos de forma regular a lo largo de las microfibras. La principal función química del ácido empleado es su habilidad de liberar iones hidronio ( $H_3O^+$ ) que penetran en las regiones amorfas de las microfibras de C e inician la protonación del oxígeno de los enlaces glicosídicos entre dos unidades de glucosa, lo cual lleva a la hidrólisis de estos dominios. Gracias a la diferencia entre las cinéticas de hidrólisis de las regiones cristalinas y amorfas, debido a la variación que presentan en su nivel de ordenamiento molecular y a que las primeras son insolubles en el ácido, se puede dar una hidrólisis selectiva, para no afectar los dominios cristalinos. Además, este tratamiento puede hidrolizar los residuos de pectina y hemicelulosa al degradar estos polisacáridos en azúcares simples. Al final del proceso, la suspensión turbia se somete a repetidos lavados (3-4 veces) por medio de centrifugación y una posterior diálisis con el fin de eliminar el ácido residual, grupos sulfato no reactivos, sales neutralizadas y azúcares solubles. (George y Sabapathi, 2015; Trache y col., 2017).

La combinación del tratamiento químico con un proceso mecánico posterior permite la producción de NC de menor tamaño y con una mayor cristalinidad. Al someter la suspensión de NC a un tratamiento de ultrasonificación, las fuerzas hidrodinámicas de las ondas de ultrasonido pueden romper los débiles enlaces de los agregados de NC, separándolos y generando así una dispersión homogénea. Es posible que al finalizar la hidrólisis, la dimensión de los nanocristales en cuanto a su longitud no sea uniforme; esto se puede solucionar al aplicar una homogeneización a los NC para así obtener un tamaño uniforme y una menor longitud (Ng y col., 2015).

## 6.2 Rendimiento de celulosa y de nanocristales de celulosa

Diversos autores reportan contenido de celulosa alrededor del 30 % en la composición química del olote (Córdoba y col., 2013). Este valor difiere del rendimiento de C obtenido en este trabajo ( $\approx 21$  %), esta discrepancia se puede atribuir a que a lo largo del proceso de extracción por medio del tratamiento alcalino y el posterior blanqueamiento, se perdió materia en los constantes lavados.

Respecto al rendimiento de la extracción de nanocristales a partir del olote (O) por medio de la hidrólisis ácida y la ultrasonificación, algunos autores reportan rendimientos del 6 % (Ditzel y col., 2017), valor similar al obtenido en este trabajo ( $\approx 5.7$  %); sin embargo, otros autores reportan rendimientos del 57 % utilizando otros tratamientos mecánicos, esta diferencia puede deberse a que el efecto de las ondas de ultrasonido no es selectivo, lo cual significa que se eliminan tanto las regiones amorfas como las cristalinas, por lo que los rendimientos obtenidos de NC son menores al 10 % (Trache y col., 2017).

## 6.3 Elaboración de películas de celulosa, nanocristales de celulosa y quitosano

Una gran cantidad de biopolímeros se han estudiado para el desarrollo de películas que puedan tener aplicación en el empaqueo de alimentos. Ejemplos de estos biopolímeros son el quitosano y la celulosa. A pesar de que la estructura cristalina de la C es una propiedad muy importante que convierte a este polisacárido en una materia prima interesante para el desarrollo de nuevos biomateriales, esta

cristalinidad forma una fuerte red de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares que hacen que la C sea insoluble en agua y otros solventes comunes, lo que limita su uso como único componente en la elaboración de películas. Es por esto último que diversas investigaciones han evaluado el uso de la C como un agente de reforzamiento que pueda modificar las propiedades funcionales de películas elaboradas a base de otros polisacáridos, como el Q (Cazón y col., 2020).

Al igual que la C, el Q es insoluble en solventes polares, ya que la solubilidad depende de su grado de N-acetilación y de su peso molecular; sin embargo, puede ser fácilmente disuelto en soluciones acuosas acidificadas con un pH menor a su pKa que es 6.3 (cuando los grupos amino libres están completamente protonados), aunque concentraciones mayores al 2 % de Q pueden generar soluciones muy viscosas. Para la elaboración de las películas de Q por el método de vaciado en caja es necesario disolver el Q en agua ligeramente acidificada y, si se requiere, añadir un plastificante; después, la solución se vierte en una superficie plana (caja Petri) y el solvente es evaporado (Cazón y col., 2017).

Para mejorar la funcionalidad de las películas, el Q debe ser mezclado con otros biopolímeros como polisacáridos, proteínas y lípidos; en general, las mezclas con polisacáridos tienen ventajas comparadas con las mezclas con proteínas y/o lípidos, tales como que tienen un costo menor, la materia prima es más abundante y tienen una mayor termoestabilidad y solubilidad en agua. Además, al añadir nanocristales de celulosa como agentes de reforzamiento en soluciones de polisacáridos como C y Q, pueden aumentar las propiedades mecánicas, de barrera y térmicas de las películas elaboradas a base de estas soluciones, debido a que los NC tienen interacciones fuertes entre ellos por sus enlaces de hidrógeno y estos mismos enlaces promueven la interacción entre los NC y la matriz polimérica (Azeredo y col., 2016; Kumar y col., 2020).

Durante el secado en horno, las altas temperaturas y la evaporación del agua son factores que reducen las distancias entre los NC lo que promueve un mayor contacto

molecular y causa su aglomeración. La explicación a esto es que la naturaleza hidrofílica de los NC puede inducir la formación de enlaces de hidrógeno una vez que sus grupos hidroxilo en la superficie externa se aproximan entre ellos de 0.25 a 0.35 nm. Bajo estas situaciones, es difícil que se produzca el efecto del reforzamiento de los NC en matrices poliméricas después de su secado en horno debido a que los fuertes enlaces intermoleculares formarían un material sólido con propiedades y características en cuanto a dureza semejantes a una piedra o al marfil; por lo tanto, los NC aglomerados serían difíciles de ser dispersados en la solución de la matriz polimérica, tal como se observó en las películas C:NC:Q, que en ciertas zonas mostraron aglomeración de NC (Ng y col., 2015).

Otra forma de modificar las características fisicoquímicas de las películas elaboradas a base de polisacáridos, es con la adición de un plastificante como el glicerol (hidrofílico). Generalmente, los plastificantes son añadidos para disminuir las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas poliméricas, lo cual da flexibilidad al material y disminuye la temperatura de transición vítrea (temperatura en el cual un polímero cambia de un estado rígido y quebradizo a otro blando y flexible) (Sabbah y col., 2019).

## 6.4 Caracterización de las películas

### 6.4.1 Contenido de humedad

Un material hidrofílico gana o pierde humedad para alcanzar el equilibrio con su ambiente. Debido a la naturaleza hidrofílica de las películas elaboradas, éstas interactúan con la humedad que les rodea; entre mayor sea el número de grupos hidroxilo expuestos, mayor es la afinidad de las moléculas de agua hacia el material, aumentando en consecuencia su contenido de humedad (CH) (Cazón y col., 2020).

El valor de CH obtenido es similar al reportado en la literatura para matrices de polisacáridos que ronda alrededor del 20 % (Liu y col., 2020). Comparando las películas de C:Q y de Q, hubo una clara disminución en el CH de las primeras, esto se puede deber a que las interacciones que se dan a través de enlaces de hidrógeno

entre la C y el Q bloquean los grupos hidroxilo que se asocian con el agua del ambiente, reduciendo así el CH. Al añadir NC también hubo una disminución significativa del CH debido a las razones mencionadas anteriormente y a que su estructura cristalina dificulta el acceso del agua dentro de la matriz formada (Nur Hazirah y col., 2016).

#### 6.4.2 Solubilidad en agua

La solubilidad en agua (SA) de una matriz polimérica se define como la cantidad de material desplazado de la película hacia la fase acuosa; si la estructura polimérica tiene menor organización molecular se espera un mayor porcentaje de SA. Algunos autores reportan valores de SA para películas de Q adicionadas con NC del 21 %, el cual es similar al obtenido en este trabajo (Deng y col., 2017).

La SA de las películas de C y NC con respecto a las de Q fue significativamente menor debido a que el entrecruzamiento químico dentro de una matriz polimérica hidrofílica dificulta su SA. Además, la adición de NC restringe la difusión de las moléculas de agua dentro de la estructura polimérica, debido a su alto grado de cristalinidad y, en consecuencia, retarda la SA de los materiales. Por lo tanto, ya que los NC inducen un aumento en la cohesión entre todos los componentes de las películas, lo que a su vez reduce los grupos hidroxilo disponibles para interactuar con el agua, la SA es inversamente proporcional a la concentración de NC (Liu y col., 2019).

#### 6.4.3 Permeabilidad al vapor de agua

Controlar las tasas de transmisión de vapor de agua de un material de empaque es un factor crítico para lograr la calidad, seguridad y amplia vida de anaquel requeridas para productos sensibles a la humedad. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) indica la cantidad de agua que permea por unidad de área y tiempo ( $\text{g/m s Pa}$ ) y toma en cuenta la diferencia de presiones y el espesor del material evaluado. Las películas hechas a base de polisacáridos como el Q, generalmente son bastante hidrofílicas, por lo que tienen propiedades de barrera deficientes (Sabbah y col., 2019).

Las películas de C:Q y C:NC:Q presentaron valores de PVA semejantes a los reportados por Cazón y col. (2017) ( $6.6 \times 10^{-13}$  –  $1.6 \times 10^{-11}$ ) ; sin embargo, autores reportan que las películas de Q tienen una PVA de  $3.65 \times 10^{-10}$  (Salari y col., 2018), valor que difiere significativamente del obtenido en el presente trabajo ( $7.8 \times 10^{-13}$ ). Se esperaba que con la adición de los NC se redujera la PVA, debido a las interacciones formadas entre la matriz polimérica y los NC, las cuales reducen la disponibilidad de grupos hidrofílicos, disminuyendo sus interacciones con moléculas de agua y, por consiguiente, reduciendo la tasa de transferencia de vapor de agua. Lo anterior sí sucedió al comparar las películas de C:Q y C:NC:Q, ya que la PVA de esta última fue menor; sin embargo, la película de Q presentó un valor de PVA aún más bajo, lo cual no es congruente con lo reportado en literatura (Cazón y col., 2017).

Es importante señalar la relación directamente proporcional que existe entre el contenido de humedad y la PVA y que se pudo observar en los valores obtenidos en este estudio, en el caso de las películas de C:Q y C:NC:Q, donde la película con un mayor CH también tenía un valor de PVA mayor (Sánchez Aldana y col., 2015). Este fenómeno no se observó en la película de Q por lo que, aunado a lo mencionado anteriormente, se puede concluir que las mediciones del valor de PVA se realizaron de manera incorrecta.

#### 6.4.4 Espesor

El principal factor que determina el espesor (E) de una película es el total de sólidos presentes en la solución filmogénica previa, entre mayor sea la concentración de sólidos, el espesor de la película también será mayor, lo cual se observó en las películas de C y NC comparadas con las de Q; sin embargo, debido a que el contenido de sólidos totales no varió entre las películas de C:Q y C:NC:Q, no hubo diferencia significativa entre sus E. Es importante señalar que los E de las películas elaboradas fueron unas 10 veces mayores al de películas sintéticas de polietileno de baja densidad que varía de 15 a 50  $\mu\text{m}$  y también difirieron con respecto al de otras películas biodegradables a base de polímeros que puede ir de 110 a 250  $\mu\text{m}$  (Sánchez Aldana y col., 2015).

La diferencia anterior de E pudo deberse a la variación del polisacárido empleado, el método de elaboración de la película o los volúmenes utilizados, ya que para obtener películas con E similares, es necesario utilizar volúmenes de suspensión iguales con el mismo contenido de sólidos totales. Cabe agregar que el E puede afectar las propiedades de barrera de los materiales, particularmente la de permeabilidad al vapor de agua debido a las diferencias entre la presión de vapor debajo de la película y aquella de la humedad sobre su superficie (Escamilla-García y col., 2017).

#### 6.4.5 Resistencia a la tensión

La resistencia a la tensión (RT) es una propiedad que permite evaluar la capacidad del material de resistir el rompimiento al ser sometido a una elongación (Mahajan y Deshmukh, 2015). Diversos autores reportan un incremento en la RT al añadir NC a las matrices poliméricas; la mejora en esta propiedad se debe a la formación de fuertes interacciones y enlaces de hidrógeno entre los nanocristales y la matriz polimérica; adicionalmente, la presencia del glicerol como agente plastificante ayuda a incrementar la dispersión y la interacción entre todos los componentes del material (Kassab y col., 2019).

En las películas elaboradas no se observó una diferencia significativa en sus valores de RT, lo que implica que la adición de los NC no mejoró las propiedades mecánicas, lo anterior pudo deberse a la heterogeneidad de la película de C:NC:Q por la aglomeración de los NC en ciertas zonas; esta aglomeración induce puntos de estrés en la matriz polimérica que son susceptibles a ser menos resistentes a la elongación y, por lo tanto, la película llega a su punto de quiebre con una menor fuerza. Otros parámetros también pudieron afectar las propiedades mecánicas del material con NC, entre ellas el método de extracción del NC o la forma de preparar la solución filmogénica (Ferreira y col., 2018).

#### 6.4.6 Color

El color del material de empaque es un factor importante que el consumidor toma en cuenta al momento de la elección de un producto. Los cambios en la coloración de

las películas dependiendo su composición pueden ser descritos utilizando diferentes parámetros de color. El parámetro  $a^*$  hace referencia al valor cromático de rojo a verde y el parámetro  $b^*$  corresponde al valor cromático de amarillo a azul, es decir, la tendencia a valores positivos de  $a^*$  indican que las películas tienden al color rojo, mientras que valores positivos del parámetro  $b^*$  indican la tendencia hacia una coloración amarilla. Al incorporar los NC los valores de  $a^*$  y  $b^*$  se incrementaron, lo cual indica que la película de C:NC:Q es más rojiza y amarillenta; por otro lado, la película de Q presentó el valor más bajo de  $b^*$ , lo que implica que es la que tiene una coloración azul mayor; estas observaciones concuerdan con lo reportado por otros autores (Salari y col., 2018; Liu y col., 2020).

Un valor más alto en la luminosidad ( $L^*$ ) indica que la película es más clara y transparente. Las películas con C tuvieron un valor menor de  $L^*$ , ya que la formación de enlaces entre la matriz polimérica de Q y otros compuestos disminuye el valor de  $L^*$  de las películas, por lo tanto, estos resultados indican que la película de Q tiende a ser más blanca (Gutiérrez y col., 2015). Otro parámetro utilizado para describir la coloración de las películas es la  $\Delta E$ , la cual indica el grado de diferencia de color total con respecto a la placa blanca de referencia. La  $\Delta E$  de las películas con C y NC fue significativamente mayor con respecto a la de Q, y entre ambas la de NC tuvo un valor menor, lo anterior corrobora lo mencionado sobre que la película de Q es la más blanca de las tres elaboradas, ya que entre menor sea el valor de  $\Delta E$  la película tiende a ser más blanca (Salari y col., 2018).

#### 6.4.7 Características topográficas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La técnica de AFM recolecta información de la morfología de la superficie de películas más que por visualización, por sensación, y esta información es obtenida a través de la medición de los cambios de magnitud de la interacción entre la sonda y la superficie de la muestra (García y col., 2018). La topografía de las películas se evaluó a través de dos parámetros de rugosidad:  $R_a$  (promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas medidas a partir de la línea central) y  $R_q$  (valor cuadrático medio de las desviaciones de las alturas) (Escamilla-García y col., 2017).

La película de Q mostró la superficie menos rugosa, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Escamilla-García y col., 2013). Las películas aumentaron su rugosidad al incorporar otros componentes como la C y los NC a la matriz polimérica. El incremento significativo de la rugosidad al agregar los NC pudo deberse a la falta de homogeneidad de la película elaborada por la formación de agregados nanocristalinos (Ng y col., 2015).

#### 6.4.8 Espectroscopía FTIR

Se utilizó espectroscopía FTIR para investigar las interacciones intermoleculares de la matriz polimérica de quitosano al añadir celulosa y nanocristales de celulosa. En los tres espectros se presentaron picos en la región 850 a 640  $\text{cm}^{-1}$  que se asumen son característicos de la composición química del olote. Al añadir el quitosano aparecieron sus picos característicos del grupo amino en 2920  $\text{cm}^{-1}$  y los de las amidas en la región de 1650 a 1410  $\text{cm}^{-1}$  y desaparecieron bandas de la celulosa de 2933 y 1319  $\text{cm}^{-1}$  (Salari y col., 2018).

El amplio pico en la región de 3500 a 3300  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de estiramiento del enlace de hidrógeno O-H indicando fuertes interacciones entre los NC y el Q a través de enlaces de hidrógeno. Las bandas en la región de 1650 a 1410  $\text{cm}^{-1}$  tuvieron una mayor intensidad en la película de C:NC:Q; además el pico de 1030  $\text{cm}^{-1}$  también presentó una intensidad mayor con la adición de los NC. Estos resultados indican que la unión entre el Q y los NC se da a través de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno (Deng y col., 2017).

Se esperaba que la intensidad del pico de la región de 3500 a 3300  $\text{cm}^{-1}$  incrementara progresivamente de acuerdo a la forma de la C (pura y NC); esto se debe a que el área superficial expuesta de las fibras aumenta con la reducción de la dimensión de las fibras, generando una mayor cantidad de grupos hidroxilo expuestos en la superficie; por lo tanto, el efecto de reforzamiento de las fibras de celulosa aumentaría gradualmente con el procesamiento de las fibras al proveer una mayor cantidad de sitios activos para el enlace de hidrógeno entre la C y otro

polímero como el Q (Ng y col., 2015).

#### 6.4.9 Ensayo de biodegradabilidad

La biodegradación es definida como un evento que ocurre a través de la acción de enzimas y/o la descomposición química inducidas por microorganismos (hongos, bacterias). La biodegradación de biopolímeros como celulosa, quitosano, almidón y proteínas, provenientes de recursos naturales, involucra el rompimiento hidrolítico o enzimático de los enlaces de hidrógeno del polímero. Los productos resultantes de este proceso incluyen CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, agua, biomasa y otras sustancias naturales. Es importante resaltar que la biodegradabilidad es un prerrequisito esencial para la compostabilidad, es decir, un material que es compostable se considera también biodegradable; sin embargo, no necesariamente un material biodegradable puede ser denominado como compostable (Zhong y col., 2019).

La prueba realizada demostró que las películas de C:Q y C:NC:Q, y en menor medida la de Q, actuaron como sustrato de la mezcla de hongos, lo cual indicó que las tres formulaciones producen materiales biodegradables. El retraso en el crecimiento de los hongos sobre la superficie de las películas se debió a la presencia del Q, que es un agente antifúngico que provoca la permeabilización de la superficie celular de numerosos hongos por medio de interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de los grupos amino protonados del Q y las cargas negativas de las moléculas en la superficie celular; en general, la permeabilización desencadena la pérdida de material intracelular lo que lleva a la muerte celular y, por lo tanto, la inhibición del crecimiento fúngico (Verlee y col., 2017; Fernandez-Bats y col., 2018).

Diversos estudios han resaltado que la adición de NC a matrices poliméricas mejora su capacidad de biodegradación, debido a que se incrementa la hidrofiliidad de la película por la naturaleza hidrofílica de los NC. En el caso de la degradación enzimática, los microorganismos que actúan durante el proceso son hidrofílicos, por lo tanto, hidrolizan los enlaces de los NC aumentando la porosidad de la matriz polimérica, lo cual favorece la tasa de biodegradación del material. La cristalinidad y

el tamaño de los NC influyen en la tasa de biodegradación, ya que las regiones cristalinas son más resistentes a la hidrólisis, esto se observó en la película de C:NC:Q, en donde el crecimiento fúngico tardó en comenzar (hasta el día 20) y al final de la prueba, el material no fue cubierto por completo por los hongos, a diferencia de la película de C:Q, donde el crecimiento comenzó desde el día 10 y al final tuvo una cobertura total de hongos (Ferreira y col., 2018).

#### 6.4.10 Compostabilidad de las películas

Cuando termina la vida útil de los bioplásticos, una de las formas más utilizadas para su desecho es por medio de su compostaje. Frecuentemente, se asume que los polímeros naturales como la celulosa y el quitosano son biodegradables y amigables con el ambiente; sin embargo, los materiales biodegradables no necesariamente son compostables, es decir, que tengan la capacidad de desintegrarse en pequeños fragmentos y que los productos de esta degradación no representen un daño al ambiente en términos de ecotoxicidad (Gutiérrez, 2018; Kalita y col., 2020). El compostaje también es definido como un proceso natural en el que la materia orgánica puede ser descompuesta por microorganismos (hongos y bacterias) presentes en el medio, los cuales hidrolizan y metabolizan las macromoléculas para convertirlas en dióxido de carbono, agua y humus (Luzi y col., 2015).

Algunas normas internacionales establecen que cualquier material es considerado como compostable si después de seis meses bajo condiciones de compostaje a 58 °C su peso inicial disminuye en un 90 %; otros estándares consideran compostables a los homopolímeros y mezclas de polímeros que reducen en 180 días su peso inicial en un 60 % y 90 %, respectivamente, además que al menos 10 % del peso seco original del material debe tener un tamaño de partícula menor a 2 mm después de doce semanas de compostaje (Gutiérrez, 2018).

En este estudio no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de compostabilidad de las diferentes películas a pesar que algunos autores sugieren que la incorporación de agentes de reforzamiento como los NC incrementa el

volumen molar de las películas a base de polisacárido debido a la gran cantidad de grupos hidrofílicos que tienen en los extremos de sus cadenas poliméricas, haciendo más fácil que los microorganismos presentes en la composta penetren en su estructura polimérica provocando una tasa más alta de compostabilidad. Las diferencias de color y fragilidad observadas al aumentar el tiempo de compostaje se debieron a la erosión polimérica provocada por el ataque de los microorganismos (Gutiérrez y col., 2019). En el Anexo A.3 se muestra la Figura 21 con los datos de la pérdida de peso a lo largo del tiempo de compostaje.

Otros estudios han reportado que películas con NC (30 % p/p) tienen una compostabilidad por debajo del 5 % a los 15 días del compostaje; este valor es considerablemente menor al obtenido en el ensayo, pero se debe a la diferencia en la concentración de los NC añadidos a las soluciones filmogénicas (Salehpour y col., 2018). En el caso de las películas de Q, autores reportan una compostabilidad del 15 % a los 12 días; la diferencia entre este dato y el obtenido en la experimentación puede deberse a que las condiciones de compostabilidad variaron de un estudio a otro (Suriyatem y col., 2018).

## 7. CONCLUSIONES

Los rendimientos obtenidos a partir del olote de maíz por medio de los tratamientos alcalino, de blanqueamiento e hidrólisis ácida fueron menores a los reportados en otras investigaciones.

Se observó que las películas con los NC fueron las que menor homogeneidad tuvieron en su apariencia. Comparadas con las películas de Q, las de C:Q y C:NC:Q presentaron menor contenido de humedad, menor % de solubilidad en agua y menor luminosidad, tuvieron valores más altos en cuanto a su espesor y rugosidad, y presentaron una biodegradabilidad mayor.

Al comparar las películas de C:Q y C:NC:Q, se observó que la adición de los NC disminuyó el valor de PVA y el contenido de humedad, lo cual le confiere al material mejores propiedades de barrera, y aumentó la luminosidad de las películas.

Por medio de la espectroscopía FTIR se comprobó la interacción del quitosano con la celulosa y los NC, al observarse una mayor amplitud de la banda en la región de la vibración de los grupos O-H y una mayor intensidad de los picos de los grupos C=O, HN-CO y C-O, indicando que las interacciones de los diferentes componentes de las películas se dio a través de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno.

Debido a las ventajas en cuanto a biodegradabilidad, bajo costo y propiedades de barrera mejoradas, las películas desarrolladas a base de quitosano, celulosa y nanocristales de celulosa podrían ser utilizadas como un sustituto de materiales no sustentables como el plástico y el aluminio, utilizados en la envoltura y empaque de alimentos y otros productos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Abdul-Khalil** HPS, Saurabh CK, Adnan AS, Nurul Fazita MR, Syakir MI, Davoudpour Y, Rafatullah M y col. A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. *Carbohydr Polym.* **2016**;150:216-226.

**Andreu-Hayles** L, Levesque M, Martin-Benito D, Huang W, Harris R, Oelkers R, Leland C y col. A high yield cellulose extraction system for small whole wood samples and dual measurement of carbon and oxygen stable isotopes. *Chem Geol.* **2019**;504:53-65.

**Azeredo** HMC, Rosa MF, Mattoso LHC. Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Ind Crops Prod.* **2016**;97:664-671.

**Bajpai** VK, Kamle M, Shukla S, Mahato DK, Chandra P, Hwang SK, Kumar P y col. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *J Food Drug Anal.* **2018**;26:1201-1214.

**Bonardd** S, Robles E, Barandiaran I, Saldías C, Leiva Á, Kortaberria G. Biocomposites with increased dielectric constant based on chitosan and nitrile-modified cellulose nanocrystals. *Carbohydr Polym.* **2018**;199:20-30.

**Bono** A, Ying PH, Yan FY, Muei CL, Sarbatly R, Krishnaiah D. Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose from palm kernel cake. *Adv Nat Appl Sci.* **2009**;3:5-11.

**Calderón-Aguirre** ÁG, Chavarría-Hernández N, Mendoza-Mendoza B, Vargas-Torres A, García-Hernández E, Rodríguez-Hernández AI. Antilisterial activity and physical-mechanical properties of bioactive caseinate films. *CYTA - J Food.* **2015**;13:483-490.

**Calvino** C, Macke N, Kato R, Rowan SJ. Development, processing and applications of bio-sourced cellulose nanocrystal composites. *Prog Polym Sci.* **2020**;101221.

**Cazón** P, Velazquez G, Ramírez JA, Vázquez M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging : A review. *Food Hydrocoll.* **2017**;68:136-148.

**Cazón** P, Velázquez G, Vázquez M. Regenerated cellulose films combined with glycerol and polyvinyl alcohol: effect of moisture content on the physical properties. *Food Hydrocoll.* **2020**;105657.

**Chao** D, Xin M, Jingru M, Khan IH, Lei DAI, Khan A, Xing- AN. Chitosan as a preservative for fruits and vegetables: a review on chemistry and antimicrobial properties. *J Bioresour Bioprod.* **2019**;4:11-21.

**Chaudhary** S, Kumar S, Kumar V, Sharma R. Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: composition, fabrication and developments in last decade. *Int J Biol Macromol.* **2020**;152:154-170.

**Cherif** M, Ayed N, Horriche J, Belgaied S. Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity. *Arab J Chem.* **2017**;10:S1938-S1954.

**Claro** P, de Campos A, Corrêa A, Rodrigues V, Luchesi B, Silva L, Tonoli G y col. Curaua and eucalyptus nanofiber films by continuous casting: mixture of cellulose nanocrystals and nanofibrils. *Cellulose.* **2019**;26:2453-2470.

**Córdoba** J, Salcedo E, Rodríguez R, Zamora J, Manríquez R, Contreras H, Robledo J, Delgado E. Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Rev Latinoam Química.* **2013**;41:171-184.

**Deng** Z, Jung J, Zhao Y. Development, characterization, and validation of chitosan adsorbed cellulose nanofiber (CNF) films as water resistant and antibacterial food contact packaging. *LWT - Food Sci Technol.* **2017**;83:132-140.

**Ditzel** FI, Prestes E, Carvalho BM, Demiate IM, Pinheiro LA. Nanocrystalline cellulose extracted from pine wood and corncob. *Carbohydr Polym.* **2017**;157:1577-1585.

**Dungani** R, Karina M, Subyakto, Sulaeman A, Hermawan D, Hadiyane A. Agricultural waste fibers towards sustainability and advanced utilization: A review. *Asian J Plant Sci.* **2016**;15:42-55.

**Escamilla-García** M, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez JJ, Farrera-Rebollo RR, Andraca-Adame JA, Arzate-Vázquez I, Mendez-Mendez J V., Moreno-Ruiz LA. Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. *Int J Biol Macromol.* **2013**;61:196-203.

**Escamilla-García** M, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez JJ, Mendoza-Madrugal AG, Di Pierro P, García-Almendárez BE, Amaro-Reyes A, Regalado-González C. Physical, structural, barrier, and antifungal characterization of chitosan-zein edible films with added essential oils. *Int J Mol Sci.* **2017**;18.

**Escamilla-García** M, Reyes-Basurto A, García-Almendárez B, Hernández-

Hernández E, Calderón-Domínguez G, Rossi-Márquez G, Regalado-González C. Modified starch-chitosan edible films: physicochemical and mechanical characterization. *Coatings*. **2017**;7:224.

**Espitia PJP**, Du WX, Avena-Bustillos R de J, Soares N de FF, McHugh TH. Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties - a review. *Food Hydrocoll*. **2014**;35:287-296.

**Evans SK**, Wesley ON, Nathan O, Moloto MJ. Chemically purified cellulose and its nanocrystals from sugarcane baggase: isolation and characterization. *Heliyon*. **2019**;5:e02635.

**Fernandez-Bats I**, Di Pierro P, Villalonga-Santana R, Garcia-Almendarez B, Porta R. Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins. *Food Hydrocolloid*. **2018**;82:106-115.

**Ferreira FV**, Dufresne A, Pinheiro IF, Souza DHS, Gouveia RF, Mei LHI, Lona LMF. How do cellulose nanocrystals affect the overall properties of biodegradable polymer nanocomposites: A comprehensive review. *Eur Polym J*. **2018**;108:274-285.

**Ferrer A**, Pal L, Hubbe M. Nanocellulose in packaging: advances in barrier layer technologies. *Ind Crops Prod*. **2017**;95:574-582.

**Galiwango E**, Abdel Rahman NS, Al-Marzouqi AH, Abu-Omar MM, Khaleel AA. Isolation and characterization of cellulose and  $\alpha$ -cellulose from date palm biomass waste. *Heliyon*. **2019**;5:e02937.

**Garavand F**, Rouhi M, Razavi SH, Cacciotti I, Mohammadi R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *Int J Biol Macromol*. **2017**;104:687-707.

**García M**, Delgado F, Escamilla M, García B. Métodos modernos para la caracterización de películas y recubrimientos comestibles. *BioTecnología*. **2018**;22:37-54.

**Gennadios A**, Weller CL, Gooding H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *J Food Eng*. **1994**;21:395-409.

**George J**, Sabapathi SN. Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties,

and applications. *Nanotechnol Sci Appl.* **2015**;8:45-54.

**Geueke** B, Groh K, Muncke J. Food packaging in the circular economy: overview of chemical safety aspects for commonly used materials. *J Clean Prod.* **2018**;193:491-505.

**Gouvêa** DM, Mendonça RCS, Soto ML, Cruz RS. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. *LWT - Food Sci Technol.* **2015**;63:85-91.

**Grande-Tovar** CD, Chaves-Lopez C, Serio A, Rossi C, Paparella A. Chitosan coatings enriched with essential oils: effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. *Trends Food Sci Technol.* **2018**;78:61-71.

**Grumezescu** AM, Holban AM. *Food Packaging and Preservation.* London: Elsevier, **2018**:66.

**Gutiérrez** TJ. Are modified pumpkin flour/plum flour nanocomposite films biodegradable and compostable? *Food Hydrocolloid.* **2018**;83:397-410.

**Gutiérrez** TJ, Tapia MS, Pérez E, Famá L. Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. *Food Hydrocolloid.* **2015**;45:211-217.

**Gutiérrez** TJ, Toro-Márquez LA, Merino D, Mendieta JR. Hydrogen-bonding interactions and compostability of bionanocomposite films prepared from corn starch and nano-fillers with and without added Jamaica flower extract. *Food Hydrocolloid.* **2019**;89:283-293.

**El Halal** SLM, Colussi R, Deon VG, Pinto VZ, Villanova FA, Carreño NLV, Dias ARG, Zavareze EDR. Films based on oxidized starch and cellulose from barley. *Carbohydr Polym.* **2015**;133:644-653.

**Hamad** AF, Han JH, Kim BC, Rather IA. The intertwine of nanotechnology with the food industry. *Saudi J Biol Sci.* **2018**;25:27-30.

**Hamidon** MH, Sultan MTH, Ariffin AH, Shah AUM. Effects of fibre treatment on mechanical properties of kenaf fibre reinforced composites: a review. *J Mater Res Technol.* **2019**;8:3327-3337.

**He** X, Deng H, Hwang H min. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *J Food Drug Anal.* **2019**;27:1-21.

**Ibrahim** S, El-Khawas KM. Development of eco-environmental nano-emulsified active coated packaging material. *J King Saud Univ - Sci.* **2019**;31:1485-1490.

**Jiang** T, Duan Q, Zhu J, Liu H, Yu L. Starch-based biodegradable materials: challenges and opportunities. *Adv Ind Eng Polym Res.* **2020**;3:8-18.

**Kabir** E, Kaur R, Lee J, Kim K-H, Kwon EE. Prospects of biopolymer technology as an alternative option for non-degradable plastics and sustainable management of plastic wastes. *J Clean Prod.* **2020**;120536.

**Kaisangsri** N, Kowalski RJ, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N, Ganjyal GM. Cellulose fiber enhances the physical characteristics of extruded biodegradable cassava starch foams. *Ind Crops Prod.* **2019**;142:111810.

**Kalita** NK, Bhasney SM, Mudenur C, Kalamdhad A, Katiyar V. End-of-life evaluation and biodegradation of poly(lactic acid) (PLA)/polycaprolactone (PCL)/microcrystalline cellulose (MCC) polyblends under composting conditions. *Chemosphere.* **2020**;125875.

**Karmaus** AL, Osborn R, Krishan M. Scientific advances and challenges in safety evaluation of food packaging materials: Workshop proceedings. *Regul Toxicol Pharmacol.* **2018**;98:80-87.

**Kassab** Z, Aziz F, Hannache H, Ben Youcef H, El Achaby M. Improved mechanical properties of k-carrageenan-based nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals. *Int J Biol Macromol.* **2019**;123:1248-1256.

**Kerch** G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends Food Sci Technol.* **2015**;46:159-166.

**Kim** JH, Shim BS, Kim HS, Lee YJ, Min SK, Jang D, Abas Z, Kim J. Review of nanocellulose for sustainable future materials. *Int J Precis Eng Manuf - Green Technol.* **2015**;2:197-213.

**Kumar** S, Mukherjee A, Dutta J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends Food Sci Technol.* **2020**;97:196-209.

**Kusmono**, Abdurrahim I. Water sorption, antimicrobial activity, and thermal and mechanical properties of chitosan/clay/glycerol nanocomposite films. *Heliyon.* **2019**;5:e02342.

**Leceta** I, Guerrero P, Cabezudo S, De K. Environmental assessment of chitosan-based films. *J Clean Prod.* **2013**;41:312-318.

**Lindström** T. Aspects on nanofibrillated cellulose (NFC) processing, rheology and NFC-film properties. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* **2017**;29:68-75.

**Liu** W, Wu R, Wang B, Hu Y, Hou Q, Zhang P, Wu R. Comparative study on different pretreatment on enzymatic hydrolysis of corncob residues. *Bioresource Technol.* **2020**;295:122244.

**Liu** Y, Yu Y, Wang Q, Xu J, Fan X, Wang P, Yuan J. Biological–chemical modification of cellulose nanocrystal to prepare highly compatible chitosan-based nanocomposites. *Cellulose.* **2019**;26:5267-5279.

**Liu** Z, Lin D, Lopez-Sanchez P, Yang X. Characterizations of bacterial cellulose nanofibers reinforced edible films based on konjac glucomannan. *Int J Biol Macromol.* **2020**;145:634-645.

**Luzi** F, Fortunati E, Puglia D, Petrucci R, Kenny JM, Torre L. Study of disintegrability in compost and enzymatic degradation of PLA and PLA nanocomposites reinforced with cellulose nanocrystals extracted from *Posidonia oceanica*. *Polym Degrad Stab.* **2015**;121:105-115.

**Mahajan** HS, Deshmukh SR. Development and evaluation of gel-forming ocular films based on xyloglucan. *Carbohydr Polym.* **2015**;122:243-247.

**Majid** I, Ahmad Nayik G, Mohammad Dar S, Nanda V. Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *J Saudi Soc Agric Sci.* **2018**;17:454-462.

**Melikoğlu** AY, Bilek SE, Cesur S. Optimum alkaline treatment parameters for the extraction of cellulose and production of cellulose nanocrystals from apple pomace. *Carbohydr Polym.* **2019**;215:330-337.

**Mohlala** LM, Bodunrin MO, Awosusi AA, Daramola MO, Cele NP, Olubambi PA. Beneficiation of corncob and sugarcane bagasse for energy generation and materials development in Nigeria and South Africa: a short overview. *Alexandria Eng J.* **2016**;55:3025-3036.

**Moustafa** H, Youssef AM, Darwish NA, Abou-Kandil AI. Eco-friendly polymer composites for green packaging: future vision and challenges. *Compos Part B Eng.*

2019;172:16-25.

**Mphahlele** RR, Caleb OJ, Ngcobo MEK. Effects of packaging and duration on quality of minimally processed and unpitted litchi cv. '*Mauritius*' under low storage temperature. *Heliyon*. 2020;6:e03229.

**Mu** R, Hong X, Ni Y, Li Y, Pang J, Wang Q, Xiao J, Zheng Y. Recent trends and applications of cellulose nanocrystals in food industry. *Trends Food Sci Technol*. 2019;93:136-144.

**Mujtaba** M, Salaberria AM, Andres MA, Kaya M, Gunyakti A, Labidi J. Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films. *Int J Biol Macromol*. 2017;104:944-952.

**Navas** CS, Reboredo MM, Granados DL. Comparative study of agroindustrial wastes for their use in polymer matrix composites. *Procedia Mater Sci*. 2015;8:778-785.

**Negm** NA, Hefni HHH, Abd-Elaal AA, Badr EA, Abou Kana MTH. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *Int J Biol Macromol*. 2020.

**Ng** HM, Sin LT, Tee TT, Bee ST, Hui D, Low CY, Rahmat AR. Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Compos Part B Eng*. 2015;75:176-200.

**Nur-Hazirah** MASP, Isa MIN, Sarbon NM. Effect of xanthan gum on the physical and mechanical properties of gelatin-carboxymethyl cellulose film blends. *Food Packag Shelf Life*. 2016;9:55-63.

**Ouarhim** W, Zari N, Bouhfid R, Qaiss A el kacem. Mechanical and physical testing of biocomposites, fibre-reinforced composites and hybrid composites. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019;43-60.

**Pathakoti** K, Manubolu M, Hwang HM. Nanostructures: Current uses and future applications in food science. *J Food Drug Anal*. 2017;25:245-253.

**Pointner** M, Kuttner P, Obrlik T, Jäger A, Kahr H. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agron Res*. 2014;12:391-396.

**Rodsamran** P, Sothornvit R. Renewable cellulose source: isolation and characterisation of cellulose from rice stubble residues. *Int J Food Sci Technol*. 2015;50:1953-1959.

**Sabbah** M, Di Pierro P, Cammarota M, Dell'Olmo E, Arciello A, Porta R. Development and properties of new chitosan-based films plasticized with spermidine and/or glycerol. *Food Hydrocolloid*. **2019**;87:245-252.

**Sahraee** S, Milani JM, Regenstein JM, Kafil HS. Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: A review. *Food Biosci*. **2019**;32.

**Salari** M, Khiabani MS, Mokarram RR, Ghanbarzadeh B, Kafil HS. Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Food Hydrocolloid*. **2018**;84:414-423.

**Salehpour** S, Jonoobi M, Ahmadzadeh M, Siracusa V, Rafieian F, Oksman K. Biodegradation and ecotoxicological impact of cellulose nanocomposites in municipal solid waste composting. *Int J Biol Macromol*. **2018**;111:264-270.

**Sánchez-Aldana** D, Contreras-Esquivel JC, Nevárez-Moorillón G V., Aguilar CN. Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano. *CYTA - J Food*. **2015**;13:17-25.

**Sedayu** BB, Cran MJ, Bigger SW. A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings. *Carbohydr Polym*. **2019**;216:287-302.

**Sharma** A, Thakur M, Bhattacharya M, Mandal T, Goswami S. Commercial application of cellulose nano-composites – a review. *Biotechnol Reports*. **2019**;21:e00316.

**SIAP**. Boletín mensual de producción maíz grano. **2018**.

**Sothornvit** R. Nanostructured materials for food packaging systems: new functional properties. *Curr Opin Food Sci*. **2019**;25:82-87.

**Sousa** AMM, Gonçalves MP. Strategies to improve the mechanical strength and water resistance of agar films for food packaging applications. *Carbohydr Polym*. **2015**;132:196-204.

**Suderman** N, Isa MIN, Sarbon NM. The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: a review. *Food Biosci*. **2018**;24:111-119.

**Suriyatem** R, Auras RA, Rachtanapun P. Improvement of mechanical properties and thermal stability of biodegradable rice starch-based films blended with carboxymethyl chitosan. *Ind Crops Prod*. **2018**;122:37-48.

- Takada M**, Niu R, Minami E, Saka S. Characterization of three tissue fractions in corn (*Zea mays*) cob. *Biomass and Bioenergy*. **2018**;115:130-135.
- Tang Y**, Zhang X, Zhao R, Guo D, Zhang J. Preparation and properties of chitosan/guar gum/nanocrystalline cellulose nanocomposite films. *Carbohydr Polym*. **2018**;197:128-136.
- Thakur R**, Pristijono P, Scarlett CJ, Bowyer M, Singh SP, Vuong Q V. Starch-based films: Major factors affecting their properties. *Int J Biol Macromol*. **2019**;132:1079-1089.
- Trache D**, Hussin MH, Haafiz MKM, Thakur VK. Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. *Nanoscale*. **2017**;9:1763-1786.
- Valdés A**, Mellinas AC, Ramos M, Garrigós MC, Jiménez A. Natural additives and agricultural wastes in biopolymer formulations for food packaging. *Front Chem*. **2014**;2:1-10.
- Valizadeh S**, Naseri M, Babaei S, Hosseini SMH, Imani A. Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid. *Int J Biol Macromol*. **2019**;134:604-612.
- Van Den Broek LAM**, Knoop RJI, Kappen FHJ, Boeriu CG. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydr Polym*. **2015**;116:237-242.
- Verlee A**, Mincke S, Stevens C V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym*. **2017**;164:268-283.
- Vieira MGA**, Da Silva MA, Dos Santos LO, Beppu MM. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur Polym J*. **2011**;47:254-263.
- Vinod A**, Sanjay MR, Siengchin S, Parameswaranpillai J. Renewable and sustainable biobased materials: an assessment on biofibers, biofilms, biopolymers and biocomposites. *J Clean Prod*. **2020**;47:254-263.
- Wang L**, Heising J, Fogliano V, Dekker M. Fat content and storage conditions are key factors on the partitioning and activity of carvacrol in antimicrobial packaging. *Food Packag Shelf Life*. **2020**;24:100500.
- Wang Y**, Yuan L, Tian H, Zhang L, Lu A. Strong, transparent cellulose film as gas barrier constructed via water evaporation induced dense packing. *J Memb Sci*. **2019**;585:99-108.

**Youssef** AM, El-Sayed SM. Bionanocomposites materials for food packaging applications: concepts and future outlook. Carbohydr Polym. **2018**;193:19-27.

**Zhong** Y, Godwin P, Jin Y, Xiao H. Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: a mini-review. Adv Ind Eng Polym Res. **2019**;3:27-35.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

# ANEXOS

## A.1 Norma ASTM G21-09 para la evaluación de la biodegradabilidad de las películas



Designation: G21 – 09

### Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi<sup>1</sup>

This standard is issued under the fixed designation G21; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscripted epsilon ( $\epsilon$ ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

#### 1. Scope

1.1 This practice covers determination of the effect of fungi on the properties of synthetic polymeric materials in the form of molded and fabricated articles, tubes, rods, sheets, and film materials. Changes in optical, mechanical, and electrical properties may be determined by the applicable ASTM methods.

1.2 The values stated in SI units are to be regarded as the standard. The inch-pound units given in parentheses are for information only.

1.3 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.*

#### 2. Referenced Documents

##### 2.1 ASTM Standards:<sup>2</sup>

- D149 Test Method for Dielectric Breakdown Voltage and Dielectric Strength of Solid Electrical Insulating Materials at Commercial Power Frequencies
- D150 Test Methods for AC Loss Characteristics and Permittivity (Dielectric Constant) of Solid Electrical Insulation
- D257 Test Methods for DC Resistance or Conductance of Insulating Materials
- D495 Test Method for High-Voltage, Low-Current, Dry Arc Resistance of Solid Electrical Insulation
- D618 Practice for Conditioning Plastics for Testing
- D638 Test Method for Tensile Properties of Plastics
- D747 Test Method for Apparent Bending Modulus of Plastics by Means of a Cantilever Beam
- D785 Test Method for Rockwell Hardness of Plastics and Electrical Insulating Materials

<sup>1</sup> This practice is under the jurisdiction of ASTM Committee G03 on Weathering and Durability and is the direct responsibility of Subcommittee G03.04 on Biological Deterioration.

Current edition approved Dec. 1, 2009. Published March 2010. Originally approved in 1961. Last previous edition approved in 2002 (D1924 – 96(02)). Redesignated G21 in 1970 (Reapproved 1990). DOI: 10.1520/G0021-09.

<sup>2</sup> For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, [www.astm.org](http://www.astm.org), or contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org). For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

D1003 Test Method for Haze and Luminous Transmittance of Transparent Plastics

D1708 Test Method for Tensile Properties of Plastics by Use of Microtensile Specimens

E96/E96M Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials

E308 Practice for Computing the Colors of Objects by Using the CIE System

##### 2.2 TAPPI Standard:

Test Method T 451-CM-484 Flexural Properties of Paper<sup>3</sup>

##### 2.3 Federal Standards:

FED STD 191 Method 5204 Stiffness of Cloth, Directional; Self Weighted Cantilever Method<sup>4</sup>

FED STD 191 Method 5206 Stiffness of Cloth Drape and Flex; Cantilever Bending Method<sup>4</sup>

#### 3. Summary of Practice

3.1 The procedure described in this practice consists of selection of suitable specimens for determination of pertinent properties, inoculation of the specimens with suitable organisms, exposure of inoculated specimens under conditions favorable to growth, examination and rating for visual growth, and removal of the specimens and observations for testing, either before cleaning or after cleaning and reconditioning.

**Note 1**—Since the procedure involves handling and working with fungi, it is recommended that personnel trained in microbiology perform the portion of the procedure involving handling of organisms and inoculated specimens.

#### 4. Significance and Use

4.1 The synthetic polymer portion of these materials is usually fungus-resistant in that it does not serve as a carbon source for the growth of fungi. It is generally the other components, such as plasticizers, cellulose, lubricants, stabilizers, and colorants, that are responsible for fungus attack on plastic materials. To assess materials other than plastics, use of this test method should be agreed upon by all parties involved. It is important to establish the resistance to microbial attack

<sup>3</sup> Available from Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI), 15 Technology Parkway South, Norcross, GA 30092, <http://www.tappi.org>.

<sup>4</sup> Available from Standardization Documents Order Desk, Bldg. 4 Section D, 700 Robbins Ave., Philadelphia, PA 19111-5094, Attn: NPODS.

Copyright © ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2950, United States.

Copyright ASTM International  
Provided by IHS under license with ASTM  
No reproduction or networking permitted without license from IHS

Licensee: Committee on Institutional Cooperation/5957194001  
Not for Resale, 02/04/2012 04:43:58 MST

under conditions favorable for such attack, namely, a temperature of 2 to 38°C (35 to 100°F) and a relative humidity of 60 to 100 %.

4.2 The effects to be expected are as follows:

4.2.1 Surface attack, discoloration, loss of transmission (optical), and

4.2.2 Removal of susceptible plasticizers, modifiers, and lubricants, resulting in increased modulus (stiffness), changes in weight, dimensions, and other physical properties, and deterioration of electrical properties such as insulation resistance, dielectric constant, power factor, and dielectric strength.

4.3 Often the changes in electrical properties are due principally to surface growth and its associated moisture and to pH changes caused by excreted metabolic products. Other effects include preferential growths caused by nonuniform dispersion of plasticizers, lubricants, and other processing additives. Attack on these materials often leaves ionized conducting paths. Pronounced physical changes are observed on products in film form or as coatings, where the ratio of surface to volume is high, and where nutrient materials such as plasticizers and lubricants continue to diffuse to the surface as they are utilized by the organisms.

4.4 Since attack by organisms involves a large element of chance due to local accelerations and inhibitions, the order of reproducibility may be rather low. To ensure that estimates of behavior are not too optimistic, the greatest observed degree of deterioration should be reported.

4.5 Conditioning of the specimens, such as exposure to leaching, weathering, heat treatment, etc., may have significant effects on the resistance to fungi. Determination of these effects is not covered in this practice.

## 5. Apparatus

5.1 *Glassware*—Glass or plastic vessels are suitable for holding specimens when laid flat. Depending on the size of the specimens, the following are suggested:

5.1.1 For specimens up to 75 mm (3 in.) in diameter, 4¼ by 4¼ in. (100 by 100 mm) plastic boxes<sup>3</sup> or 150-mm (6-in.) covered Petri dishes, and

5.1.2 For 75 mm (3 in.) and larger specimens, such as tensile and stiffness strips, large Petri dishes, trays of borosilicate glass, or baking dishes up to 400 by 500 mm (16 by 20 in.) in size, covered with squares of window glass.

5.2 *Incubator*—Incubating equipment for all test methods shall maintain a temperature of 28 to 30°C (82.4 to 86°F) and a relative humidity not less than 85 %. Automatic recording of wet and dry-bulb temperature is recommended.

## 6. Reagents and Materials

6.1 *Purity of Reagents*—Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society,

where such specification are available.<sup>6</sup> Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

6.2 *Purity of Water*—Unless otherwise indicated, references to water shall be understood to mean distilled water or water of equal or higher purity.

6.3 *Nutrient-Salts Agar*—Prepare this medium by dissolving in 1 L of water the designated amounts of the following reagents:

Potassium dihydrogen orthophosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.7 g
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.7 g
Ammonium nitrate (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1.0 g
Sodium chloride (NaCl)	0.005 g
Ferrous sulfate (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.002 g
Zinc sulfate (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.002 g
Manganous sulfate (MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	0.001 g
Agar	15.0 g
Potassium monohydrogen orthophosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.7 g

6.3.1 Sterilize the test medium by autoclaving at 121°C (250°F) for 20 min. Adjust the pH of the medium by the addition of 0.01 N NaOH solution so that after sterilization the pH is between 6.0 and 6.5.

6.3.2 Prepare sufficient medium for the required tests.

6.3.3 *Nutrient-Salts Broth*—Prepare using the formula in 6.3, omitting the agar. Broth may be filter sterilized to avoid the precipitation of the salts that occurs with autoclaving.

6.4 *Mixed Fungus Spore Suspension*:

Note: 2—Since a number of other organisms may be of specific interest for certain final assemblies or components, such other pure cultures of organisms may be used if agreed upon by the purchaser and the manufacturer of the plastic. Reference (1)<sup>7</sup> illustrates such a choice.

6.4.1 Use the following test fungi in preparing the cultures:

Fungus	ATCC No. <sup>8</sup>	MYCO No. <sup>9</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	9642	386
<i>Penicillium pinophilum</i> <sup>F</sup>	11707	391
<i>Chaetium globosum</i>	6205	450
<i>Gliocladium virans</i>	9645	365
<i>Auroobasidium pullulans</i>	15233	279c

<sup>8</sup> Available from American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852.

<sup>9</sup> Available from Mycological Services, P.O. Box 1056, Crawfordsville, IN 47933.

<sup>F</sup> Historically known as *P. funiculosum*.

6.4.1.1 Maintain cultures<sup>8</sup> of these fungi separately on an appropriate medium such as potato dextrose agar. The stock cultures may be kept for not more than four months at approximately 3 to 10°C (37 to 50°F). Use subcultures incubated at 28 to 30°C (82 to 86°F) for 7 to 20 days in preparing the spore suspension.

6.4.1.2 Prepare a spore suspension of each of the five fungi by pouring into one subculture of each fungus a sterile 10-mL portion of water or of a sterile solution containing 0.05 g/L of

<sup>6</sup> Reagent Chemicals, American Chemical Society Specifications, American Chemical Society, Washington, DC. For suggestions on the testing of reagents not listed by the American Chemical Society, see *Annual Standards for Laboratory Chemicals*, BDH Ltd., Poole, Dorset, U.K., and the *United States Pharmacopoeia and National Formulary*, U.S. Pharmaceutical Convention, Inc. (USPC), Rockville, MD.

<sup>7</sup> The boldface numbers given in parentheses refer to a list of references at the end of the practice.

<sup>8</sup> Historically known as *P. funiculosum*.

<sup>3</sup> Available from Tri-State, Inc., Henderson, KY.

a nontoxic wetting agent such as sodium dioctyl sulfosuccinate. Use a sterile platinum or nichrome inoculating wire to gently scrape the surface growth from the culture of the test organism.

6.4.2 Pour the spore charge into a sterile 125-mL glass-stoppered Erlenmeyer flask containing 45 mL of sterile water and 10 to 15 solid glass beads, 5 mm in diameter. Shake the flask vigorously to liberate the spores from the fruiting bodies and to break the spore clumps.

6.4.3 Alternatively, the spore charge can be poured into a sterile glass tissue grinder and gently ground to break up the spore clumps and liberate the spores from the fruiting bodies.

6.4.4 Filter the shaken or ground suspension through a thin layer of sterile glass wool in a glass funnel into a sterile flask in order to remove mycelial fragments.

6.4.5 Centrifuge the filtered spore suspension aseptically, and discard the supernatant liquid. Resuspend the residue in an aliquot of sterile water and centrifuge.

6.4.6 If large mycelia fragments or clumps of agar were dislodged during the harvesting, wash the spores in this manner three times to remove possible nutrient carryover from the original cultures. Dilute the final washed residue with sterile nutrient-salts solution (see Note ) in such a manner that the resultant spore suspension shall contain  $1\,000\,000 \pm 200\,000$  spores/mL as determined with a counting chamber.

6.4.7 Repeat this operation for each organism used in the test and blend equal volumes of the resultant spore suspension to obtain the final mixed spore suspension.

6.4.8 The spore suspension may be prepared fresh each day or may be held in the refrigerator at 3 to 10°C (37 to 50°F) for not more than four days.

## 7. Viability Control

7.1 With each daily group of tests place each of three pieces of sterilized filter paper, 25 mm (1 in.) square, on hardened nutrient-salts agar in separate Petri dishes. Inoculate these with the spore suspension by spraying the suspension from a sterilized atomizer<sup>9</sup> so that the entire surface is moistened with the spore suspension. Incubate these at 28 to 30°C (82 to 86°F) at a relative humidity not less than 85% and examine them after 14 days' incubation. There shall be copious growth on all three of the filter paper control specimens. Absence of such growth requires repetition of the test.

## 8. Test Specimens

8.1 The simplest specimen may be a 50 by 50-mm (2 by 2-in.) piece, a 50-mm (2-in.) diameter piece, or a piece (rod or tubing) at least 76 mm (3 in.) long cut from the material to be tested. Completely fabricated parts or sections cut from fabricated parts may be used as test specimens. On such specimens, observation of effect is limited to appearance, density of growth, optical reflection or transmission, or manual evaluation of change in physical properties such as stiffness.

8.2 Film-forming materials such as coatings may be tested in the form of films at least 50 by 25 mm (2 by 1 in.) in size.

<sup>9</sup> DeVilbiss No. 163 atomizer or equivalent has been found satisfactory for this purpose.

Such films may be prepared by casting on glass and stripping after cure, or by impregnating (completely covering) filter paper or ignited glass fabric.

8.3 For visual evaluation, three specimens shall be inoculated. If the specimen is different on two sides, three specimens of each, face up and face down, shall be tested.

NOTE 3—In devising a test program intended to reveal quantitative changes occurring during and after fungal attack, an adequate number of specimens should be evaluated to establish a valid value for the original property. If five replicate specimens are required to establish a tensile strength of a film material, the same number of specimens shall be removed and tested for each exposure period. It is to be expected that values of physical properties at various stages of fungal attack will be variable; the values indicating the greatest degradation are the most significant (see 4.4). Reference (2) may be used as a guide.

## 9. Procedure

9.1 *Inoculation*—Pour sufficient nutrient-salts agar into suitable sterile dishes (see 5.1) to provide a solidified agar layer from 3 to 6 mm ( $\frac{1}{4}$  to  $\frac{3}{4}$  in.) in depth. After the agar is solidified, place the specimens on the surface of the agar. Inoculate the surface, including the surface of the test specimens, with the composite spore suspension by spraying the suspension from a sterilized atomizer<sup>9</sup> so that the entire surface is moistened with the spore suspension.

### 9.2 Incubation Conditions:

9.2.1 *Incubation*—Cover the inoculated test specimens and incubate at 28 to 30°C (82 to 86°F) and not less than 85% relative humidity.

NOTE 4—Covered dishes containing nutrient agar are considered to have the desired humidity. Covers on large dishes may be sealed with masking tape.

9.2.2 *Incubation Duration*—The standard length of the test is 28 days of incubation. The test may be terminated in less than 28 days for samples exhibiting a growth rating of two or more. The final report must detail the actual duration of incubation.

9.3 *Observation for Visible Effects*—If the test is for visible effects only, remove the specimens from the incubator and rate them as follows:

Observed Growth on Specimens (Sporulating or Non-Sporulating, or Both)	Rating
None	0
Traces of growth (less than 10%)	1
Light growth (10 to 30%)	2
Medium growth (30 to 60%)	3
Heavy growth (60% to complete coverage)	4

NOTE 5—A rating of trace or no growth (one or less) must be confirmed by microscopic observation particularly since non-sporulating growth may not be readily observed without the aid of a microscope. The report should note the magnification of the microscope used to confirm the observation.

9.3.1 Traces of growth may be defined as scattered, sparse fungus growth such as might develop from a mass of spores in the original inoculum, or extraneous contamination such as fingermarks, insect feces, etc. Continuous cobwebby growth extending over the entire specimen, even though not obscuring the specimen, should be rated as two.

NOTE 6—Considerable physical change in plastics may occur without

much visual growth, hence some measure of change in physical property selected from those cited in the appendix is recommended.

9.4 *Effect on Physical, Optical, or Electrical Properties*—Wash the specimens free of growth, immerse in an aqueous solution of mercuric chloride (1 + 1000) for 5 min, rinse in tap water, air dry overnight at room temperature, and recondition at the standard laboratory conditions defined in Practice D618, 23D618 ± 1°C (73 ± 2°F) and 50 ± 2 % relative humidity, and test according to the respective methods used on control specimens (see the appendix).

Note 7—For certain electrical tests, such as insulation and arc resistance, specimens may be tested in the unwashed, humidified condition. Test values will be affected by surface growth and its associated moisture.

10. Report

- 10.1 Report the following information:
  - 10.1.1 Organisms or organism used,

- 10.1.2 Time of incubation (if progressive),
- 10.1.3 Visual rating of fungus growth according to 9.3, and
- 10.1.4 Tabulation of progressive change in physical, optical, or electrical property against time of incubation. Give the number of observations, the mean, and the maximum observed change.

11. Precision and Bias

11.1 A precision and bias statement cannot be made for this practice at this time.

12. Keywords

12.1 fungal biosusceptibility; fungal decay; microbiological assay; microbiological susceptibility

APPENDIX

(Nonmandatory Information)

X1. TEST METHODS FOR EVALUATION OF EFFECT OF FUNGI ON SYNTHETIC POLYMERIC MATERIALS

X1.1 For evaluation of the effect of fungi on mechanical, optical, and electrical properties, the following ASTM and other test methods are recommended.

TABLE X1.1 Recommended Test Methods

Property	Test Methods
Tensile strength	D638, D882, D1708 <sup>A</sup> , D638D1708
Stiffness	D747 <sup>A</sup> , D747
TAPPI Test Method T 451-M-45 <sup>A</sup>	
Fed. Std. No. 191, Method 5204 <sup>A</sup>	
(Clark Stiffness Test)	
Fed. Std. No. 191, Method 5206 <sup>A</sup>	
(Cantilever Bend Method)	
Hardness	D785 <sup>A</sup> , D785
Optical transmission	E308 <sup>A</sup> , E308
Haze	D1003 <sup>A</sup> , D1003
Water vapor transmission	E96/E96M <sup>A</sup> , E96/E96M
Dielectric strength	D149 <sup>A</sup> , D149
Dielectric constant-power factor	D150 <sup>A</sup> , D150
Insulation resistance	D257 <sup>A</sup> , D257
Arc resistance	D495 <sup>A</sup> , D495

<sup>A</sup> These designations refer to the test methods given in Section 2.

## REFERENCES

- (1) Bagdon, V. J., Military Specification Mil-P-43018(CE), "Plastic Sheets: Polyethylene Terephthalate, Drafting, Coated," June 13, 1961.
- (2) *ASTM Manual on Presentation of Data and Control Chart Analysis*, ASTM STP 15D, ASTM.
- (3) Baskin, A. D., and Kaplan, A. M., "Mildew Resistance of Vinyl-Coated Fabrics," *Applied Microbiology*, Vol 4, No. 6, November 1956.
- (4) Berk, S., "Effect of Fungus Growth on Plasticized Polyvinyl Chloride Films," *ASTM Bulletin*, No. 168, September 1950, p. 53 (TP 181).
- (5) Berk, S., Ebert, H., and Teitell, L., "Utilization of Plasticizers and Related Organic Compounds by Fungi," *Industrial and Engineering Chemistry*, Vol 49, No. 7, July 1957, pp. 1115-1124.
- (6) Brown, A. E., "Problem of Fungal Growth on Synthetic Resins, Plastics, and Plasticizers," *Modern Plastics*, Vol 23, 1946, p. 189.
- (7) Ross, S. H., "Biocides for a Strippable Vinyl Plastic Barrier Material," *Report PB-151-119*, U.S. Department of Commerce, Office of Technical Services.

ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.

This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of the standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.

This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2050, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-0595 (phone), 610-832-0555 (fax), or [service@astm.org](mailto:service@astm.org) (e-mail); or through the ASTM website ([www.astm.org](http://www.astm.org)). Permission rights to photocopy the standard may also be secured from the ASTM website ([www.astm.org/COPYRIGHT/](http://www.astm.org/COPYRIGHT/)).

A.2 Biodegradabilidad de las películas (progresión)

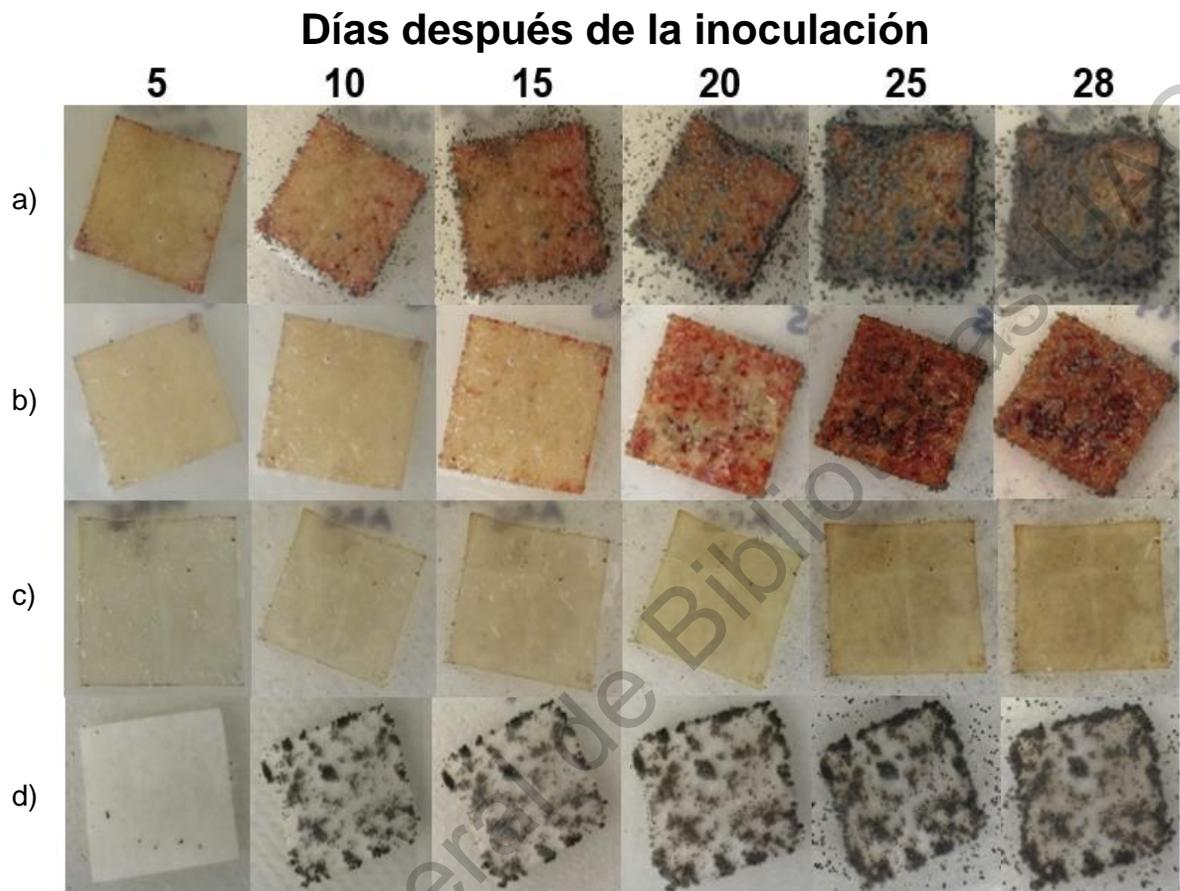


Figura 20. Progresión de la biodegradabilidad de las películas de a) celulosa, b) nanocristales de celulosa, c) quitosano y d) papel filtro observada en los días 5, 10, 15, 20, 25 y 28 después de la inoculación de la mezcla de esporas.

### A.3 Pérdida de peso de las películas en composta

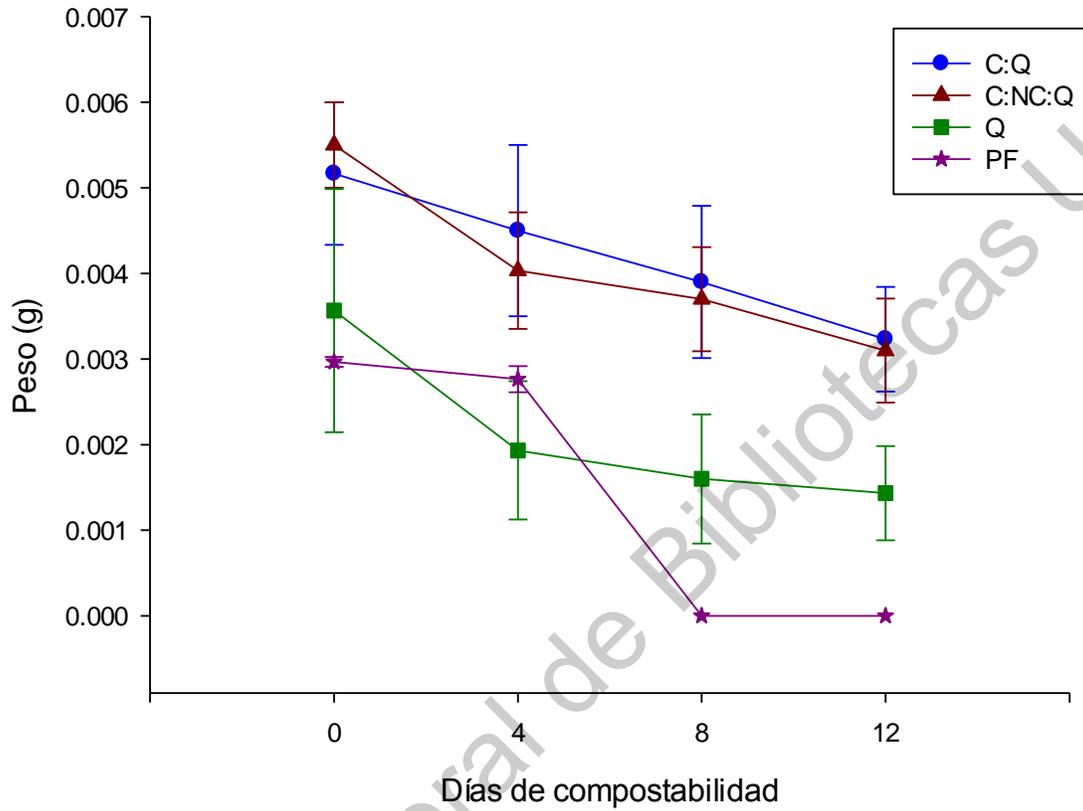


Figura 21. Pérdida de peso de las diferentes películas a lo largo del proceso de compostaje (12 días). C = Celulosa, NC = Nanocristales de celulosa, Q = Quitosano, PF = Papel filtro.