

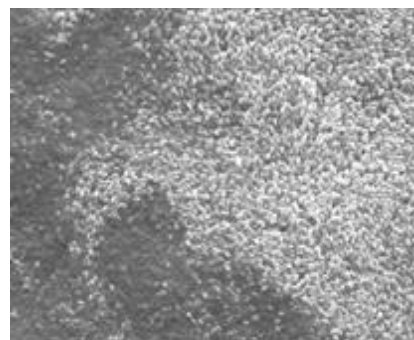
**BIODEGRADACIÓN MEDIOAMBIENTAL DE FILMES
AGRÍCOLAS DE ACOLCHADO BASADOS EN POLIOLEFINAS.
EFECTO DE LA FOTODEGRADACIÓN Y DE ADITIVOS
PRO-OXIDANTES.**

Jesús Luis Pablos Lagartos

Directoras

Dra. Concepción Abrusci Bernal, UAM

Dra. Teresa Corrales Viscasillas, CSIC



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Grupo de Fotoquímica de Polímeros

Departamento de Química Macromolecular Aplicada

Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros



“Navega por tu vida, aunque el viento te haga naufragar....”

De un viejo amigo.

A la memoria de mi Padre

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mis directoras de Tesis, la Dra. Concepción Abrusci Bernal y la Dra. Teresa Corrales Viscasillas. Gracias por vuestra dedicación, por todo el apoyo y esfuerzo dedicados a llevar la Tesis hasta este día; gracias por las incontables horas de reuniones y trabajo codo con codo...Gracias por estar siempre ahí y por todos los buenos ratos que hemos pasado.

Quiero agradecer especialmente al Prof. Fernando Catalina por su completa dedicación a esta Tesis, porque sin su apoyo, no hubiera sido posible realizarla. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de empezar a formarme como Científico y estar siempre dispuesto a ayudarme a crecer como persona y como investigador.

Quiero dedicar esta Tesis a toda mi familia por su continuo apoyo y su ayuda en los momentos difíciles; a mí otra familia (Montse, Hilario y Elvira) y Raquel por estar siempre ahí a pesar de las dificultades y en particular a la memoria de mi Padre; le hubiera gustado verme defender este Trabajo. Gracias a enseñarme a ser mejor persona y a luchar. Sé que desde donde estés me sigues apoyando.

En segundo lugar, quiero dedicar esta Tesis a la memoria de nuestra compañera Carmen ya que empecé mi andadura en el departamento junto a ella. Me siento afortunado por haber tenido la oportunidad de trabajar a tu lado. Siempre te recordare...

Un especial recuerdo para todos mis compañeros de laboratorio, Leví, Iñigo, Mario, Sandra, Gema, Sara, Ana, Xose, Jelena...; tantos años de trabajo, tantas horas compartidas...A mis compañeros de comedor y café, Quique y Esther, por hacer las horas de descanso más divertidas. Gracias a todos amigos, por vuestra ayuda y apoyo en todo momento. Han sido unos años inolvidables.

Me gustaría agradecer también a la Dra. Paula Bosch por compartir sus conocimientos y experiencias.

Quiero agradecer también la oportunidad de aprender un poquito del apasionante mundo de la microbiología a la Dra. Irma Marín y a mis compañeros de laboratorio del departamento de Biología Molecular, Nico, Carlotta, Ana, y todos los demás que están

allí, tanto investigadores como compañeros, por ayudarme en todo momento a aprender tantas cosas tan nuevas para mí y hacer el trabajo más llevadero.

Quiero agradecer también todo el apoyo y ayuda prestada en este Trabajo al departamento de Hortofruticultura del grupo IMIDA de Murcia y en particular a la Dra. Josefa López-Marín y al Dr. Alberto González por la contribución aportada en esta Tesis.

También quiero agradecer al Centro de Tecnología de Repsol por el apoyo tecnológico prestado y en particular al Dr. Enrique Espí. Gracias por hacer posible este Trabajo.

Agradecer muy especialmente a todos los profesores del Máster Avanzado de Química de la Universidad de Burgos ya que gracias a la formación e inspiración recibida en el transcurso del Máster pude optar a realizar esta Tesis y en particular, a los profesores José Miguel García, Félix Clemente y Felipe Serna; gracias por vuestro apoyo incondicional porque sin vuestra ayuda nunca hubiera podido empezar a trabajar en el grupo de Fotoquímica Aplicada del ICTP (CSIC).

Un recuerdo especial para todos mis profesores de la Licenciatura en la Universidad de Burgos, y en especial, a Javier García Tojal y Gustavo, por estar siempre dispuestos a ayudarme y creer en mí.

En último lugar, agradecer a todos los investigadores y técnicos del Instituto que me han ayudado a lo largo de estos años...En particular, a Ángel Lozano, Esther Verde, Pablo, Justo y muchos otros que siempre estarán en mi recuerdo.

En general, gracias a todos los que, desde que empecé a formarme, han contribuido a que hoy pueda defender esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE

ÍNDICE

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
I.1. Polietilenos y copolímeros de etileno-acetato de vinilo	8
I.2. Degradación abiótica: fotoquímica y térmica	12
I.3. Biodegradación de polietilenos por microorganismos	17
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.	27
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.	31
III.1. Polímeros y productos químicos empleados en el trabajo.	31
III.2. Síntesis de aditivos pro-oxidantes.	32
III.3. Preparación de los filmes agrícolas de acolchado.	34
III.4. Degradación abiótica: Exposición a la intemperie, envejecimiento fotoquímico acelerado y tratamientos térmicos.	35
III.4.1. Exposición a la intemperie.	35
III.4.2. Envejecimiento artificial acelerado.	36
III.4.3. Tratamientos térmicos.	36
III.5. Biodegradación. Valoración de dióxido de carbono por medidas indirectas de impedancia.	37
III.6. Métodos y procedimientos microbiológicos.	40
III.6.1. Aislamiento de cepas bacterianas.	40
III.6.2. PCR: Reacción en cadena de polimerasa.	41
III.7. Técnicas instrumentales.	42
III.7.1. Análisis de emisión de quimioluminiscencia (QL).	42
III.7.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR-ATR).	44
III.7.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).	45
III.7.4. Análisis termogravimétrico (TGA).	46
III.7.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	47
III.7.6. Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS). Extracción de productos de bajo peso molecular.	47

III.7.7. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC).	48
III.7.8. Ángulo de contacto.	49
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.	53
IV.1. Aislamiento e Identificación de bacterias adheridas a los materiales.	53
IV.2. Degradación fotoquímica y térmica.56	
IV.2.1. Degradación fotoquímica de filmes de polietileno con estearatos de Fe, Ca, Co y Mn.	56
IV.2.2. Degradación termo-oxidativa de filmes de polietileno con estearatos de Ca, Fe, Co y Mn.	66
IV.2.3. Degradación fotoquímica de copolímeros etileno-acetato de vinilo (EVA) con estearatos de Fe y Ca.	77
IV.3. Biodegradación de polietilenos por bacterias.	
IV.3.1. Formación de biofilme.	77
IV.3.2. Biodegradación de filmes de polietilenos fotodegradados y termodegradados.	88
IV.3.3. Biodegradación de copolímeros EVA fotodegradados.	
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.	95
V.1. Aislamiento e identificación bacteriana y formación de biofilme.	95
V.2. Degradación fotoquímica y térmica.	98
V.2.1. Degradación fotoquímica de filmes de polietileno con estearatos de Fe, Ca, Co y Mn.	98
V.2.2. Degradación termo-oxidativa de filmes de polietileno con estearatos de Fe, Co y Mn.	104
V.2.3. Degradación fotoquímica de copolímeros etileno-acetato de vinilo (EVA) con estearatos de Fe y Ca.	106
V.3. Biodegradación bacteriana de materiales altamente degradados.	109
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.	119

BIBLIOGRAFÍA.	125
ANEXOS.	139
Anexo I. Datos adicionales (Tablas y Gráficas).	143
Anexo II. Contribución científica de la Tesis: Artículos publicados.	151

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

I. ANTECEDENTES.

La importancia de los materiales plásticos en nuestras vidas ha conseguido cifrar la producción mundial de polímeros (www.plasticsEurope.com) en 280 millones de toneladas en 2011. Por ello, el reciclado y la eliminación de los plásticos después de su utilización, han experimentado grandes avances científico-técnicos en los últimos años (Lucas, N. y cols. 2008), convirtiéndose el reciclado en un sector industrial emergente de trascendental importancia en la actualidad por sus repercusiones económicas (Raquez, J.M. y cols. 2011). Las diferentes vías de tratamiento de residuos plásticos (Scott, G. 2001; Jayasekara, R. y cols. 2005) son: *reciclado* mecánico y químico, según se dé un segundo uso al material o se obtengan los productos de partida de su síntesis; *incineración/valorización energética*, por pirólisis total o parcial para obtener combustibles; y mediante *tratamientos biológicos* tales como aguas residuales/lodos (“Sewage” - “sludge”), en abonos/tierras en condiciones anaeróbicas (“compost”, “soil”) y en enterramientos anaeróbicos (“landfill”).

En estos últimos años se ha realizado un gran esfuerzo investigador para desarrollar polímeros biodegradables (Andrady, A.L., 2011; Borghei, M. y cols. 2010), y en particular, dirigidos a las aplicaciones en agricultura y en el sector del envase y embalaje, con el fin de contribuir a la resolución del problema que suponen los polímeros como residuos sólidos en ambientes naturales y urbanos. La mayor parte de los trabajos realizados se han centrado en la síntesis de nuevos polímeros o en la preparación de formulaciones biodegradables, sin embargo, se ha prestado muy poca atención a los requisitos medioambientales necesarios, y entre ellos los microbiológicos, para que la biodegradación sea una realidad. Este hecho, ha contribuido a que la aceptación de los nuevos productos no sea general. El deterioro medioambiental de los materiales con pérdida de propiedades físicas que afectan a su integridad, frecuentemente se confunde con la biodegradación. La degradación ambiental (Catalina, F. y cols. 2004a) puede significar fragmentación, pérdida de propiedades mecánicas y, solo, en algunos casos degradación por la acción de los microorganismos presentes en el medioambiente donde se encuentra el material (Albertsson, A.C. y cols. 1990b). En la definición de biodegradación medioambiental generalmente más aceptada, los materiales plásticos biodegradables (Chiellini, E. y cols. 2002) son aquellos que experimentan cambios por acción de los agentes medioambientales de

degradación, dando lugar a compuestos de bajo peso molecular y donde al menos un paso del proceso global de degradación, transcurre a través del metabolismo de los microorganismos presentes en los entornos naturales. En la etapa final los fragmentos orgánicos se convierten en compuestos simples que dan lugar a procesos de mineralización redistribuyéndose en la naturaleza a través de ciclos elementales de transformación, tales como el del carbono y el del nitrógeno (Catalina, F. y cols. 2006).

En condiciones ambientales adecuadas de temperatura, humedad y disponibilidad de oxígeno, la biodegradación de los materiales denominados orgánicos biodegradables (alimentos, desechos vegetales, etc.) ocurre a gran velocidad, en la escala de tiempo de días-meses. En el caso de algunos polímeros, la resistencia a los microorganismos es mucho mayor y un objetivo deseable de alcanzar en los polímeros biodegradables es que la desaparición y asimilación por mineralización del material de plástico biodegradable se produzca en el intervalo de tiempo adecuado, desde meses a 1-3 años dependiendo de la aplicación. Como regla general, los polímeros naturales se biodegradan más rápidamente en el medioambiente que los polímeros sintéticos que son, o resistentes a la biodegradación o su biodegradación es muy lenta. Esta clasificación (Catalina, F. y cols. 2005) se ha complicado desde el punto de vista de la diversidad estructural de los materiales polímeros y de los posibles mecanismos combinados de la biodegradación.

En la actualidad se admiten dos mecanismos generales de biodegradación medioambiental de polímeros: 1) **Hidro-biodegradación**, que transcurre mediante biodegradación hidrolítica y que se produce en los polímeros que en su cadena principal, además de carbonos e hidrógenos, contienen heteroátomos (oxígeno, nitrógeno, etc.) y, 2) **Oxi-biodegradación**, que requiere una primera etapa de degradación oxidativa eficiente antes de la segunda etapa de biodegradación. Este mecanismo lo experimentan los polímeros de cadena principal hidrocarbonada, constituida únicamente por carbonos e hidrógenos. Ambas vías de biodegradación se resumen en la **figura I.1**.

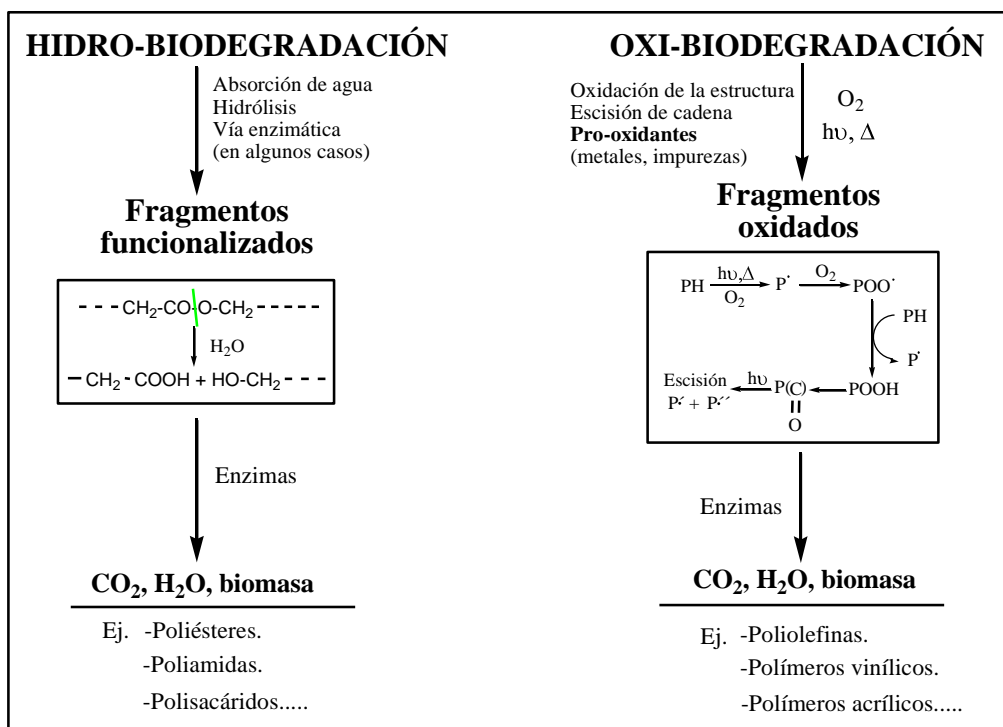


Figura I.1: Mecanismos de biodegradación de polímeros.

Los polímeros hidro-biodegradables, son los que generalmente se biodegradan más rápidamente por la eficiencia de la hidrólisis en la fragmentación de la cadena macromolecular ya que ésta se completa con procesos enzimáticos. Entre los polímeros hidrobiodegradables se encuentran los de origen natural (polisacáridos, celulósicos, polipeptídicos y poliésteres producidos por bacterias), así como, algunos polímeros de síntesis con estructura principal fácilmente hidrolizable, (poliésteres como policaprolactonas, polieteres-poliuretanos, polímeros derivados del ácido láctico, etc.). Después de la etapa de hidrólisis se obtienen fragmentos funcionalizados muy susceptibles de biodegradación por las enzimas de los microorganismos. También son biodegradables, en alguna medida, los polímeros cuya estructura puede retener humedad y cuya cadena principal es hidrolizable, como poliureas, polianhídridos, poliésteres y poliamidas, siempre dependiendo de su estructura y del entorno en que se encuentren.

Los polímeros oxi-biodegradables son en su mayoría inherentemente resistentes al ataque microbiano y sólo son biodegradables, en algunos casos, en función de su naturaleza, estructura, peso molecular, morfología, etc., siempre y cuando previamente se produzca una eficiente degradación abiótica. Así, la acción combinada de los agentes de degradación, tales como la luz solar (fotodegradación), el oxígeno (oxidación), la

humedad (degradación hidrolítica), el calor (termodegradación), etc., modifican la estructura del material polímero favoreciendo la acción de los microorganismos. Pequeñas variaciones en la estructura (ramificación, presencia de co-monómeros, oxidación durante el procesado, impurezas metálicas, restos de catalizadores, etc.) pueden dar lugar a diferencias importantes en la biodegradación del material (Gu, J.D. 2003). Dentro de estos polímeros hidrocarbonados los solubles en agua como el polialcohol vinílico y el poliácido acrílico son bastante biodegradables.

Los factores que afectan a la velocidad de biodegradación en ambos mecanismos son: a) condiciones del medio (temperatura, humedad, pH), b) estructura y morfología de los polímeros (enlaces químicos hidrolizables, hidrofilia, peso molecular, estereoquímica, superficie específica, cristalinidad) y, c) características de los microorganismos. Existe en la actualidad un gran interés en la sustitución de materiales plásticos convencionales de la moderna agricultura intensiva por materiales biodegradables. En el sector del filme agrícola (Díaz, T. y cols. 2001) los materiales para acolchado son los que han experimentado un mayor desarrollo desde el punto de vista de la biodegradación, al ser los de menor espesor y estar extendidos sobre el terreno en contacto con la tierra. También, se han sustituido materiales en otras aplicaciones agrícolas, como son pequeñas piezas, macetas, bolsas de cultivo, cordeles, pinzas, mallas, materiales para riego como tubos finos para riego por goteo, polímeros para la dosificación controlada de productos agroquímicos, etc. Los materiales biodegradables en la aplicación agrícola pueden aportar soluciones a las preocupaciones medioambientales pero también otras ventajas como: *técnicas*, solventando la dificultad que tiene la recogida de fragmentos de filmes dispersos sobre la tierra para su transporte a las plantas de reciclado; *legislativas*, evitando la incineración de los materiales en los mismos terrenos de cultivo y que en Europa se prohibió en 2002; *agronómicas*, por la posibilidad de utilizar materiales de corta duración para un único cultivo y por último *económicas*, ya que dada la mineralización no se requiere la recogida de los filmes después de la aplicación.

El método más eficiente de biodegradación de plásticos es el compostaje (Moreno, J. y cols 2005; Taiwo, A.M. 2011), sin embargo, solo es aplicable a polímeros compostables, es decir, materiales que deben pasar la norma europea UNE EN 13432, titulada "*Requisitos para embalajes recuperables a través de compostaje y biodegradación - Esquema de prueba y criterios de evaluación para la aceptación final*

de los embalajes", la cual regula y define las condiciones que deben cumplir los polímeros biodegradables para envase y embalaje, que tras su utilización, puedan eliminarse por compostaje, fijándose el porcentaje de biodegradabilidad por microorganismos en un 90%, alcanzándose este en un periodo de seis meses, y para ello, se exige que los fragmentos tengan un tamaño de partícula inferior a 2 milímetros, demostrando que el plástico no imparte efectos negativos sobre el proceso de compostaje. Para la aplicación agrícola se requiere una infraestructura que incluye el sistema de recolección de los materiales y de equipamiento técnico. Por ello, esta vía de eliminación, "ex situ", además de tener un alto coste, no supone una solución práctica para los filmes agrícolas de acolchado ya que quedan muchos fragmentos pequeños sin recoger en el suelo de cultivo, por lo que la biodegradación de estos materiales es la única vía posible para la eliminación de estos residuos. Estos filmes se disponen extendidos sobre el terreno y anclados mediante enterramiento de unos 10 cm de los bordes en la tierra (anchuras de ≈ 1 m en el acolchado parcial y muy superiores en el acolchado total) y, así serían los más adecuados para experimentar un eficiente proceso de fotodegradación y posterior biodegradación. En la **figura I.2** se muestra un filme de acolchado (A), parcialmente degradado (B) y al final de la aplicación (C) prácticamente desintegrado.



Figura I.2: Filme de acolchado sobre el terreno en diferentes estados de degradación.

En cualquier caso, es imprescindible demostrar que el filme agrícola biodegradable, además de ser idéntico en cuanto al comportamiento óptico y mecánico de los filmes clásicos, experimenta una biodegradación "in situ", relativamente rápida al final de su vida útil. El que un material sea según la definición biodegradable, puede carecer de significado desde el punto de vista práctico, pues el tiempo en el que la biodegradación transcurre puede ser considerablemente mayor que el de aplicación como material acumulándose como residuo en el medioambiente. Los filmes agrícolas que actualmente

se emplean en la aplicación de acolchado y, que se han estudiado en esta investigación, están basados en poliolefinas y en concreto en polietilenos de baja densidad por lo que su mecanismo de biodegradación sería el de oxi-biodegradación, requiriendo una degradación abiótica previa muy eficiente.

A continuación, en esta introducción al Trabajo de investigación realizado se explicarán los aspectos teóricos y antecedentes de los materiales estudiados, con descripción de los polietilenos para acolchado, la degradación que tienen lugar en su exposición a la intemperie por acción de los agentes medioambientales, y la importancia de la biodegradación.

I.1. Polietilenos y copolímeros de etileno-acetato de vinilo.

Las poliolefinas, principalmente los polietilenos, polipropilenos y sus copolímeros, constituyen la familia de polímeros de mayor consumo en la actualidad. Son los termoplásticos más importantes, debido a su combinación de propiedades como baja densidad, estabilidad química, resistencia mecánica y posibilidades de modificaciones estructurales, junto con una gran facilidad de procesado, lo que hace que se hayan introducido en innumerables aplicaciones. Actualmente, la familia de las poliolefinas representa el 5% de la producción total de materiales plásticos y el 60% de consumo dentro del sector de filmes agrícolas (www.plasticsEurope.org). Dentro de las poliolefinas, el polietileno (PE) es el polímero más sencillo desde el punto de vista de su composición química, pero muy complejo por el gran número de posibilidades estructurales y propiedades a que puede dar lugar en función de los métodos de obtención y procesado (Fatou, J. G. 1985). Con el nombre de polietileno se incluyen diferentes tipos de materiales cuya diferencia radica en el contenido en ramificaciones, factor que modifica las características de cristalinidad/densidad. Siguiendo la cronología de su descubrimiento y producción se pueden citar como materiales principales:

- Polietileno de baja densidad (**LDPE - *Low Density Polyethylene***), obtenido por polimerización radical con peróxidos a alta presión (Imperial Chemical Industries, ICI 1936) y constituido por cadenas muy ramificadas (etilo, butilo y cadenas largas) que

dificultan el proceso de cristalización (20-30 metilos por cada 1000C) dando lugar a densidades relativamente bajas (0.914-0.940 g/cm³).

- Polietileno de alta densidad (**HDPE - High Density Polyethylene**), obtenido por polimerización de coordinación con catalizadores de Ziegler-Natta (1953) en procesos de baja presión o de medias presiones, utilizando como catalizadores óxidos metálicos (proceso Phillips). La estructura está constituida por cadenas lineales con un grado de ramificación muy bajo (1-3 metilos por cada 1000C), lo que le permite alcanzar niveles de cristalinidad muy elevados y densidades relativamente altas (0.94-0.96 g/mL).

- Polietileno lineal de baja densidad (**LLDPE – Linear Low Density Polyethylene**), formado por cadenas lineales con ramificaciones controladas y que son copolímeros de etileno con α -olefina (Philips, Dow, 1957) por ejemplo, los de 1-buteno o 1-hexeno darían lugar a ramificaciones iguales de etilo o butilo respectivamente en la cadena principal.

Otro tipo de materiales, de más reciente producción lo constituyen los polietilenos de tipo **metalocénico** (Exxon, 1991), obtenidos con catalizadores de centro activo único que dan lugar a polímeros con distribuciones de peso molecular más estrechas y mayores variaciones en la densidad. Estos polietilenos metalocénicos comerciales suelen ser lineales de baja densidad, similares a los LLDPE pero con propiedades mecánicas superiores por sus elevados pesos moleculares.

Debido a su estructura química, el PE presenta estructura cristalina, es decir, parte de sus macromoléculas son capaces de empaquetarse para dar lugar a una red tridimensional ordenada. Por otro lado, la larga longitud de las cadenas junto con la presencia de ramificaciones laterales, conduce a ovillamientos moleculares que restringen este ordenamiento cristalino. De este modo, cuanto mayor sea el número de ramificaciones y/o defectos estructurales, menor será la cristalinidad del polímero resultante. La morfología de los *polímeros semicristalinos* y del polietileno en particular, está constituida por agregados cristalinos (densidad 1.014 g·cm⁻³) rodeados de zonas formadas por segmentos de cadena amorfos (densidad 0.840 g·cm⁻³), algunos de los cuales mantienen conectadas ambas fases (Basset, D.C. 1981; Wunderlich, B. 1973; Schultz, J.M. 2001). En el PE, los cristales están constituidos por segmentos que

presentan una conformación plana en forma de *zig-zag* y que dan lugar a las *lamelas*; éstas a su vez se acoplan en estructuras radiales de tamaño superior que reciben el nombre de *esferulitas* (esferas anisótropas 1-5 μm), (**Figura I.3**). La forma cristalina principal es ortorrómbica (celda unidad $a = 7.36 \text{ \AA}$, $b = 4.92 \text{ \AA}$, $c = 2.54 \text{ \AA}$).

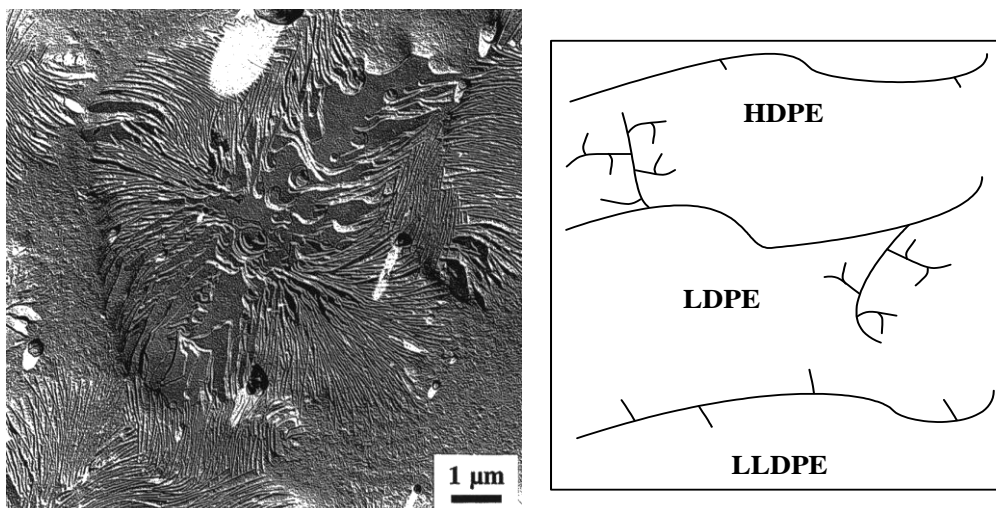


Figura I.3: Estructura ramificada de los diferentes polietilenos y microfotografía de una esferulita de LDPE, donde se observa la agrupación radial de lamelas.

En cuanto a las propiedades térmicas del PE de baja densidad (LDPE), éste presenta una temperatura de fusión (T_m) que se encuentra en el intervalo 105-120°C, y está asociada a la pérdida de ordenación por fusión de la fase cristalina que pasa desde el estado cristalino al estado fundido. La temperatura de transición vítrea (T_g), característica de la fase amorfa, está asociada a los movimientos concertados de segmentos largos de cadena y se encuentra entorno a -80°C (Boyer, R.F. 1973). A esta temperatura aparecen cambios sustanciales en el comportamiento del polímero, que pasa de ser un material vítreo y por tanto rígido, a ser un material flexible, blando y con cierta característica elástica. A temperatura ambiente el PE se encuentra entre su T_g y su T_m , y por ello es un material flexible. Se dice que el polietileno de baja densidad en estas condiciones se encuentra en “estado cuero” (“*leather state*”). Los copolímeros de etileno de mayor interés son los que se obtienen con monómeros polares o con olefinas; desde el punto de vista comercial por las aplicaciones, los más importantes en la aplicación agrícola son los de **etileno con acetato de vinilo (EVA - Ethylene-Vinyl Acetate)** por sus excelentes propiedades (**Figura I.4**).

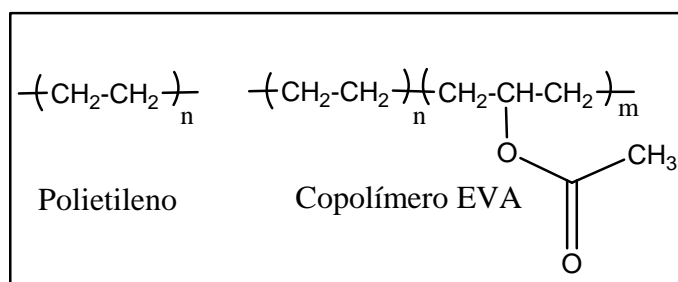


Figura I.4: Estructuras químicas de polietileno y copolímero etileno-acetato de vinilo.

La incorporación de acetato de vinilo a la estructura del polietileno produce un aumento de la flexibilidad del material, una mayor resistencia al impacto y al desgarrar, así como mayor brillo y comportamiento mejorado a bajas temperaturas (Espí, E. y cols 2004). En este trabajo se ha utilizado el copolímero EVA con un contenido en acetato de vinilo del 9 %, que se emplea en la aplicación de filme agrícola y que está llegando a desplazar al polietileno, debido a sus múltiples ventajas. De todas las propiedades que poseen los copolímeros EVA, es su efecto termoaislante el de mayor interés para las aplicaciones agrícolas. Se define el efecto termoaislante como la capacidad de absorber total o parcialmente (por los grupos acetato) la parte más importante de la radiación infrarroja re-emitida durante la noche por el suelo y las plantas que han sido calentadas por la radiación solar recibida durante el día (de 7 a 14 micras de longitud de onda, aproximadamente de 1400 a 714 cm^{-1}). La mayor polaridad y menor cristalinidad del EVA respecto del PE, produce una mejor dispersión de los aditivos de la formulación en la matriz polimérica y una menor migración de éstos a la superficie, así, se mejora la calidad general de los filmes. Algunas de las propiedades de estas poliolefinas se muestran en la (Tabla I.1), (Peacock, A.J., 2000).

Tabla I.1: Propiedades generales de algunas poliolefinas.

Propiedad	LDPE	LLDPE	HDPE	EVA
Densidad (g/cm^3)	0,915-0,935	0,910-0,925	0,941-0,967	0,925-0,95
Temperatura de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	106-112	125	130-133	100-102
Resistencia a la tracción (MPa)	6,9-17,2	14-21	18-30	10-18

I.2. Degradación abiótica: fotoquímica y térmica

La degradación de polímeros supone la evolución adversa de sus propiedades (Albertsson, A.C: y cols. 1988; Al-Madga, H. y cols. 1998) (*mecánicas*: disminución de la resistencia a la tracción y alargamiento; *ópticas*: pérdida de brillo y transparencia; *exudado de aditivos*,...) y por ello, la disminución de prestaciones durante su uso. Dentro de la degradación general de un material polímero y, en particular de un filme de poliolefina, se pueden diferenciar tres circunstancias de oxidación diferentes: *degradación térmica durante el procesado* (Hinsken, H. y cols. 1991), debido a las altas temperaturas que exige la transformación (extrusión y soplado del filme), *degradación térmica oxidativa durante la aplicación* (Lacosta, J.M. 1991), cuando se expone el material a la intemperie con el correspondiente calor diurno, y *foto degradación oxidativa* (Kamal, M.R. 1970) cuando el polímero se expone a la radiación solar que llega a la superficie terrestre (longitud de onda > 290 nm). Por tanto, todo ello hace que los materiales polímeros no puedan procesarse sin la estabilización adecuada y que los productos finales requieran, si se desea una larga duración, la incorporación de estabilizantes frente a la degradación oxidativa, térmica y fotoquímica (Celina, M. y cols. 1996).

De todos los tipos de filme agrícola que se emplean para el cultivo, los destinados al acolchado de suelos y objeto de este estudio, son los de menor espesor, generalmente comprendido entre 10 y 50 micras. Los filmes de acolchado son de corta duración (Catalina, F. y cols. 2002b) (entre uno y cuatro meses) y por tanto no suelen llevar aditivos estabilizantes.

En la primera etapa de iniciación de la degradación de una poliolefina, y en particular del polietileno, bien por acción del calor (degradación térmica) o de la luz (degradación fotoquímica) se generan radicales libres como consecuencia de la ruptura de enlaces lábiles carbono-hidrógeno, generalmente en carbonos terciarios. Ambos tipos de degradación dependen fundamentalmente de las características estructurales del polímero, tales como la energía de enlace (**Tabla I.2**), interacción entre cadenas o grado de cristalización.

Tabla I.2: Energías de disociación aproximadas de algunos enlaces químicos presentes en las poliolefinas y equivalencia energética de radiación en longitudes de onda.

Enlace	Energía de enlace (Kcal/mol)	Longitud de onda (nm)	Enlace	Energía de enlace (Kcal/mol)	Longitud de onda (nm)
C=O	186	153	C ^(terciario) -H	85	336
C=C	145	197	C-O	84,0-93	307-340
O-H	110,6	258,5	C-C	83.1	344
C ^(primario) -H	98,8	289,4	-O-O-	66	433

El PE, en cuanto a su degradación fotoquímica, por analogía con otros hidrocarburos totalmente saturados, debería ser un material relativamente estable frente a la radiación UV que forma parte del espectro solar. Sin embargo, existe una fototermooxidación que se atribuye a la existencia de grupos cromóforos capaces de absorber la radiación ultravioleta del espectro solar de longitud de onda superior a 290 nm, y cuyas estructuras generales en las poliolefinas comerciales incluyen, cetonas, peróxidos, hidroperóxidos, impurezas metálicas, etc.

Estas especies presentes como impurezas son las que se consideran responsables de la etapa de iniciación de la fotodegradación. En el polietileno de baja densidad existen además, pequeñas cantidades de insaturaciones (de tipo vinilideno y de cadena) que experimentan procesos de oxidación durante las operaciones de procesado del polímero. No obstante, en los materiales de larga duración, estas etapas iniciales de la degradación fotoquímica y térmica pueden controlarse mediante la incorporación de estabilizantes fotoquímicos y térmicos. Tal y como se muestra en la **figura I.3**, los radicales poliméricos (P·) generados por acción de la radiación solar y/o el calor en la primera etapa, reaccionan fácilmente con moléculas de oxígeno para dar radicales peroxilo (POO·) que, a su vez, pueden capturar un átomo de hidrógeno de otra macromolécula (PH) para dar los hidroperóxidos poliméricos (POOH) (Fanton, E. y cols. 1994; Arnaud, R. y cols. 1984; Gugumus, F. 1995). Estos hidroperóxidos en el polímero, pueden descomponerse (Catalina, F. y cols. 2002a) por efecto de la radiación solar y el calor, pues el enlace O-O es débil (**Tabla I.2**), provocando la propagación de los radicales alcoxilo (PO·) así generados, y la formación de grupos hidroxilo y carbonilo, capaces estos a su vez de absorber luz UV y de acelerar la fotodegradación del material a través

de reacciones de escisión de la cadena principal mediante reacciones tipo Norrish I y II (**Figura I.5**), con la consiguiente disminución del peso molecular.

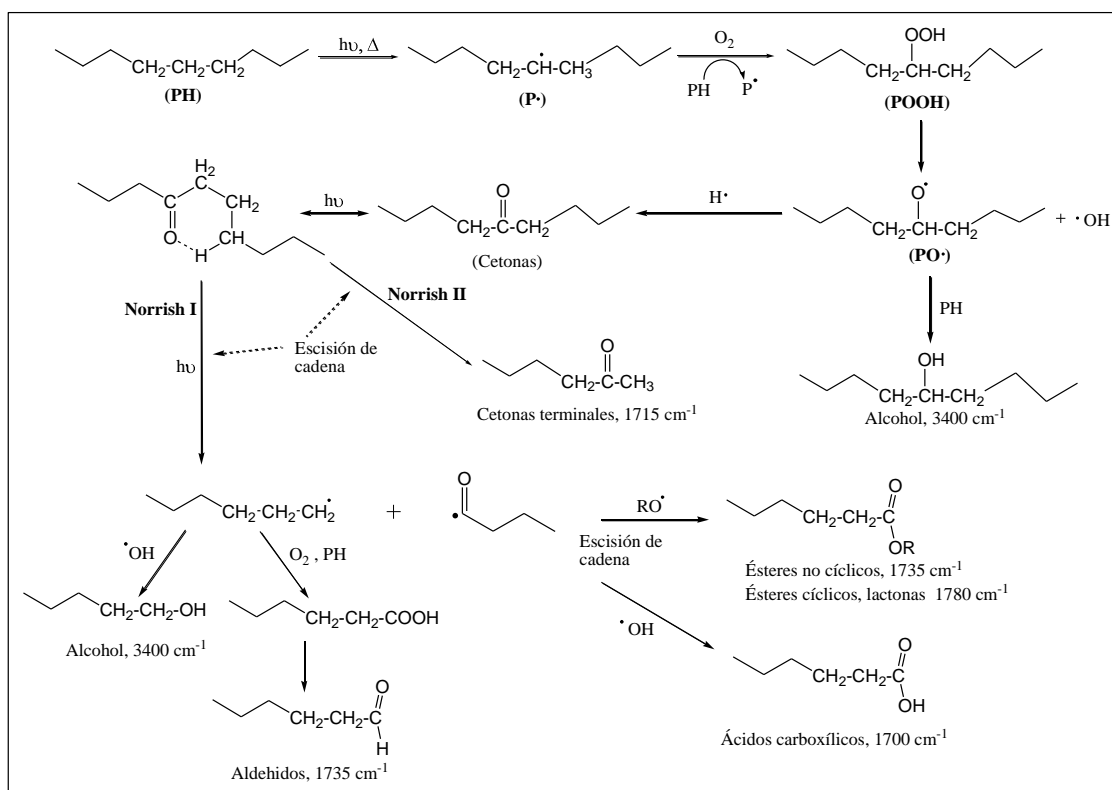


Figura I.5: Especies derivadas de la degradación fotoquímica y térmica del LDPE y sus bandas características de absorción en el Infrarrojo.

El proceso de degradación del polietileno se puede llevar a cabo mediante el estudio, y así se ha hecho en este Trabajo, del seguimiento de la formación de especies de oxidación con el tiempo. En la **figura I.5** se incluyen los datos de absorción infrarroja para el análisis por FTIR de las especies fototermogeneradas en la degradación de LDPE.

Todo lo reseñado para el polietileno resulta igualmente válido para el copolímero de etileno-acetato de vinilo EVA, aunque además, la presencia de grupos acetato puede iniciar los procesos de degradación tal y como se muestra en la **figura I.6**.

Una característica diferencial es, que además de la aparición de las bandas de oxidación típicas del PE comentadas anteriormente, se produce la disminución de la banda de

absorción infrarroja del grupo ester del grupo acetato en 1735 cm^{-1} y la generación de ácido acético tal y como se muestra en la **figura I.6**.

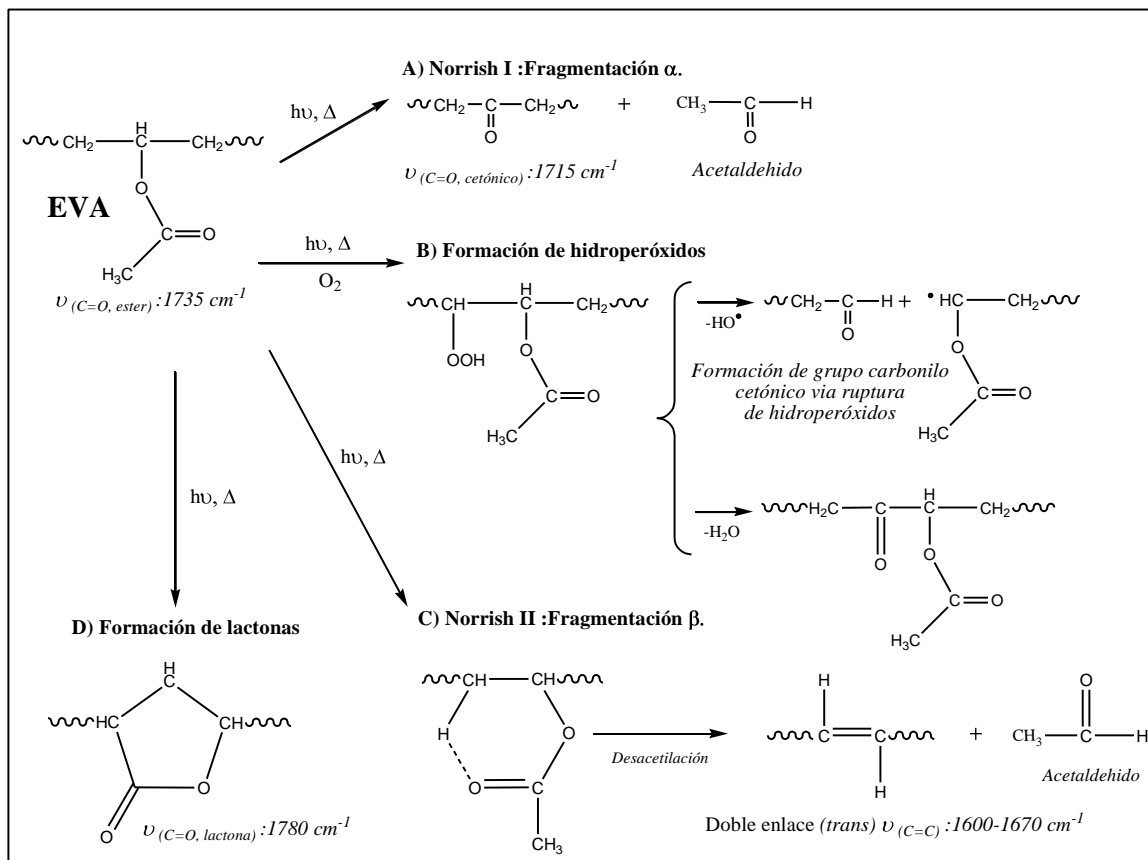
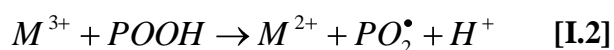
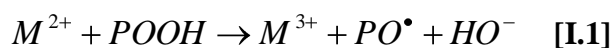


Figura I.6: Degradación fotoquímica y térmica de un copolímero EVA incluyendo las diferencias impartidas por la presencia del grupo acetato en la estructura (Abrusci, C. y cols. 2012).

Además de la espectroscopia IR, tiene especial relevancia en este trabajo el estudio de la emisión de Quimioluminiscencia para evaluar el estado de oxidación de los materiales. La quimioluminiscencia es una técnica que ha demostrado su utilidad en estos estudios por su elevada sensibilidad (Celina, M. y cols. 1993), así como por el desarrollo reciente de instrumentación (Lacey, D.J. y cols. 1996) que permite su detección de forma cuantitativa y reproducible, habiéndose utilizado en estudios de degradación de polímeros, mecanismos de oxidación y de cinética, así como para evaluar la eficiencia de estabilizantes (Catalina, F. y cols. 2002a; Rychlý, J. y cols. 2011; Weon, J.I. 2010; Koutny, M. y cols. 2008).

Los polietilenos que se utilizan en la aplicación de acolchado agrícola son los de menor espesor y no llevan estabilizantes en la formulación, excepto los estrictamente necesarios para su procesado (sistema fenol-fosfito). Los catalizadores iónicos metálicos de la degradación actúan aumentando las eficiencias de las etapas de iniciación y propagación de la degradación oxidativa (abiótica). Se han empleado diversos sistemas pro-oxidantes (Albertsson, A.C. y cols. 1991; Eubeler, J.P. y cols. 2010) basados en metales de transición, en particular de hierro que es el más empleado en aditivos comerciales, aunque recientemente también se han estudiado de forma separada pro-oxidantes de cobalto y manganeso. Estos aditivos no son comerciales como tales, por lo que no se ha realizado ningún estudio comparativo hasta la fecha, limitándose los estudios a mezclas sinérgicas que si emplean algunas empresas actualmente en sus ofertas comerciales de formulaciones en forma de granza para materiales oxidables y que generalmente son de aplicación en el sector del envase y embalaje.

Se han comparado diversos carboxilatos de cobalto de cadena larga y se ha demostrado que el estearato es el más eficiente de los pro-oxidantes estudiados (Roy, P.K. y cols. 2006a) en la fotodegradación de polietileno. Estos aditivos aceleran el proceso de fotodegradación, dando lugar a una drástica reducción del peso molecular (Scott, G. y cols. 2001; Kyrikou, I. y cols. 2007). Los complejos iónicos de metales de transición, tienen una notable capacidad para acelerar la descomposición de los hidroperóxidos formados durante el proceso de oxidación (Albertsson, A.C. y cols. 1994), según las siguientes reacciones (**Reacciones [I.1] y [I.2]**) acelerando el mecanismo de degradación tanto térmica como fotoquímica de los materiales (Allen, N.S. y cols. 1992).



La actividad catalítica de cualquier metal depende de diversos factores como su valencia y el tipo de ligando al que va asociado. El efecto catalítico es mayor en pro-oxidantes basados en metales de transición capaces de tener dos estados de oxidación de estabilidad similar y que difieran en solo una unidad (Jakubowicz, I. y cols. 2003), por ejemplo, Mn^{2+}/Mn^{3+} o Fe^{2+}/Fe^{3+} . También se ha demostrado que el efecto catalítico de la degradación de los estados de oxidación Fe^{3+} y Fe^{2+} es similar (Roy, P.K. y cols. 2009). En este Trabajo, se han sintetizado los estearatos de Fe^{3+} , Co^{2+} y Mn^{2+} y

también se ha incorporado al estudio comparativo de pro-oxidantes el estearato de Ca^{2+} , producto comercial que se emplea como lubricante en el procesado de polímeros y estabilizante antiácido (Phadke, D.S. y cols. 1996). El efecto pro-oxidante de este aditivo probado en este estudio constituye una aportación inédita en la bibliografía especializada.

I.3. Biodegradación de polietilenos por microorganismos.

La resistencia del polietileno al ataque microbiano se relaciona con su elevado carácter hidrofóbico, su elevada impermeabilidad al agua, su alto peso molecular y a la ausencia de grupos funcionales que puedan ser reconocidos por los sistemas enzimáticos de los microorganismos. Se ha observado la colonización de materiales de polietileno de bajo peso molecular por hongos (Klemme, D.E. y cols. 1950) de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. En el año 1950, con una mezcla de *A. niger*, *A. flavus* y *P. luteum* y *Trichoderma sp.*, se llegaron a reconocer pequeños crecimientos sobre PE de peso molecular promedio en peso de 10.000 y que no se observaron en muestras de peso molecular mayor. En un trabajo similar (Jen-Hao, L. y cols. 1961), se pudo seguir la biodegradación de un polietileno de peso molecular 17.000 empleando una suspensión bacteriana que contenía *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevibacterium sp.* y varias especies del género *Nocardia* y que dio lugar a crecimientos importantes en una semana de incubación. En 1972, Potts y colaboradores (Potts, J.E. y cols. 1972) ampliaron los estudios a los polietilenos de alta y baja densidad. Para llevar a cabo el trabajo prepararon como inóculo una mezcla de los géneros *A. niger*, *A. flavus*, *Chaetomium globosum* y *P. funiculosum* donde se pudieron percibir crecimientos similares en ambos polímeros a pesar de la mayor cristalinidad del polietileno de alta densidad ($P_m=11.000-14.000$). En los mismos tipos de polietilenos pero con pesos moleculares mayores no se apreciaron desarrollos microbianos, pero si se vieron importantes crecimientos de estos hongos en los materiales pirolizados anaeróbicamente ($P_m=2100-3500$). El material de mayor cristalinidad (HDPE) debería mostrar menor crecimiento de hongos y, sin embargo, el crecimiento que se identificó fue muy parecido al del LDPE, polímero de menor cristalinidad y muy ramificado. Ensayos con alcanos como el dodecano ($\text{C}_{10}\text{H}_{22}$), hexadecano ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}$) y tetracosano ($\text{C}_{24}\text{H}_{50}$) mostraron abundantes desarrollos microbianos y sus derivados metilados (2,6,11-trimetildodecano, 2,6,11,15-

tetrametilhexadecano y 2,6,10,15,19,23-hexametildodecano) no dieron lugar a crecimientos. El efecto de disminución de la biodegradación que producen las ramificaciones y el peso molecular se puso de manifiesto en otros trabajos de la época con alcanos de bajo peso molecular; por ejemplo, el alcano lineal de 32 carbonos (Colin, G. y cols. 1976) ($C_{32}H_{66}$, Pm= 451) donde se observaron abundantes crecimientos de microorganismos en condiciones adecuadas e incluso el de 44 carbonos (Haines, J.R. y cols. 1974) mostró ligeros crecimientos ($C_{44}H_{90}$ Pm= 620). En trabajos posteriores, de la empresa Unión Carbide, se estableció que la biodegradación se produce en los PE de peso molecular inferior a 500 Da y el hecho de observarlo en filmes de PE de peso molecular mayor se debió a las fracciones de menor tamaño en la distribución de pesos moleculares.

También en los años 70, se comprobó que la incorporación de un único grupo carbonilo en un alcano de cadena larga no tiene efecto en el desarrollo de hongos sobre el alcano. Este dato indicaría que la oxidación intrínseca del polietileno no parece influir en la biodegradación del polímero. Sin embargo los fragmentos de LDPE térmicamente degradados al aire, que por espectroscopia IR mostraron abundancia de grupos carbonilo en su estructura, se degradaron en los ensayos comentados anteriormente (tratamiento en lodos con aguas residuales y en tierra de jardín). La demanda biológica de oxígeno del ensayo con estos polietilenos, en un medio de tierra de cultivo (Jones, P.H. y cols. 1974), es aproximadamente 3 veces superior a la muestra control. A las 10 semanas, se alcanza el 9% de la demanda teórica de oxígeno. También se han llevado a cabo experimentos con cultivos enriquecidos con microorganismos procedentes de tierras de cultivo (Spencer, L.R. y cols. 1976) observándose el mismo efecto de biodegradación con los polietilenos altamente degradados. En estos trabajos se confirmó que las bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Gemella*, *Arthrobacter* y *Cellulomonas* eran capaces de colonizar el polietileno de bajo peso molecular.

En trabajos llevados a cabo en 1975, se determinó la biodegradación del polietileno comercial de baja densidad fotodegradado marcado con ^{14}C (Albertsson, A.C. y cols. 1976, 1977, 1978a, 1978b), para ello emplearon el método de medida de $^{14}CO_2$ y se puso de manifiesto la poca biodegradación a efectos prácticos que experimentaban los materiales incluso después de la fotooxidación. Los resultados pusieron de relieve que

el PE sin irradiar, después de 2 años de incubación en abono (“compost”) muestra una biodegradación del 0.1% y el PE irradiado, en 6 semanas de ensayo alcanza el 1%. En otros estudios se demostró (Wiles, D.M. 1973) que la presencia de especies de oxidación, hidroperóxidos y carbonilos, en la estructura del polietileno de baja densidad se localiza en la superficie del filme, ya que se producen en la degradación oxidativa que requiere la movilidad del oxígeno y, por ello, la oxidación tiene lugar fundamentalmente en la capa superficial del material (< 1 micra). Esto hace que la acción de los microorganismos sea superficial y, en consecuencia, tan lenta. Posteriormente, en 1991, se determinó por valoración de dióxido de carbono para el LDPE una mineralización de 0,35% en 2,5 años (Albertsson, A.C. y cols. 1991), mineralización prácticamente nula en comparación con su vida útil. Cuando los ensayos se llevan a cabo en suelos naturales los resultados indican que el polietileno puede tardar más de 100 años en experimentar una cierta mineralización (Ohtake, Y. y cols. 1995 y 1998). Se ha observado el proceso de biodegradación por microscopia SEM en botellas de LDPE y filmes LDPE de 60 micras enterrados en tierra de jardín en Japón. Para ello mediante el estudio de la pérdida de peso del polímero durante más de 30 años se llegó a estimar que la mineralización total de los filmes de PE es de unos 300 años. El establecimiento de ensayos adecuados de biodegradación para los materiales polímeros (Catalina, F. y cols. 2004b), es de gran importancia para la evaluación de la utilidad real de los materiales en la aplicación agrícola. Los métodos indirectos de medida del crecimiento microbiano por análisis de los productos de reacción están establecidos desde hace tiempo en diversos ensayos estándares, y la respirometría basada en la valoración del CO₂ es uno de los métodos más frecuentes. El método indirecto de impedancia fue descrito por primera vez por Owens y cols. en 1989 (Owens, J.D. y cols. 1989), con el desarrollo del equipo denominado RABIT (“rapid automated bacterial impedance technique”) desarrollado por la empresa Don Whitley Sc. Ltd., del Reino Unido. Este ha sido el método empleado en este Trabajo, empleando la metodología desarrollada en trabajos anteriores (Abrusci, C. y cols. 2007b). Las condiciones de ensayo para estudiar la biodegradación del polietileno son el factor clave para interpretar los resultados obtenidos; se pueden fijar condiciones óptimas para los microorganismos, pero no se puede acelerar la biodegradación y los ensayos en polímeros son de muy larga duración (Albertsson, A.C. y cols. 1987), tal y como veremos en este Trabajo.

En los materiales para acolchado (Briassoulis, D., 2004) la pérdida de propiedades mecánicas suele ser muy rápida ya que sus formulaciones no incorporan fotoestabilizantes. Para mejorar la biodegradación, se ha recurrido a la preparación de *mezclas de polietileno con componentes hidro-biodegradables* (Kyrikou, I. y cols. 2007; Albertsson, A.C. y cols. 1993a y b) como es el caso de los filmes basados en almidón (Abrusci, C. y cols. 2008), celulosa, caucho natural, proteínas, etc., que despertaron mucho interés dentro de los plásticos biodegradables, aún incrementando el coste final de estas formulaciones entre 3 y 6 veces. Los materiales constituidos por las mezclas de almidón se desintegran fácilmente, sin embargo, el polietileno permanece en el medioambiente prácticamente inalterado.

Los denominados polímeros oxi-biodegradables (Ojeda, T.F.M. y cols. 2009; Roy, P.K. y cols. 2011b) emplean aditivos basados en compuestos poli-insaturados, iones de metales de transición y complejos metálicos que aceleran la degradación del polietileno. Los aditivos pro-oxidantes (Koutny, M. y cols. 2006) están siendo objeto de mucho interés tecnológico, económico y social, siendo frecuente ver en periódicos y otros medios de comunicación, noticias e informaciones publicitarias referentes a estos materiales. La biodegradación empieza en la superficie y debe progresar hacia el interior del material. La velocidad del proceso de biodegradación dependerá de cómo la colonización superficial se propaga a lo largo del espesor del polietileno y, por tanto, de la eficacia de los sistemas enzimáticos generados por los microorganismos en el material; al igual que en la degradación oxidativa, es fundamental la difusión del oxígeno, el agua y otras especies que catalizan la degradación (**Figura I.7**).

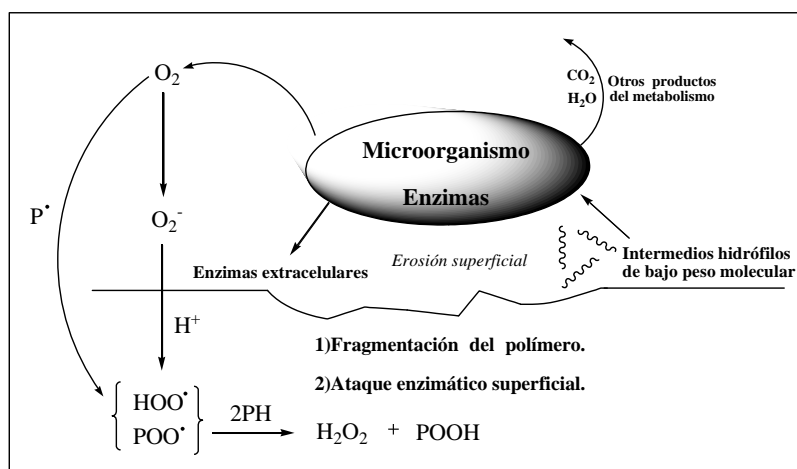


Figura I.7: Mecanismo de bio-asimilación de fragmentos de bajo peso molecular para el PE degradado abióticamente.

Las grietas, rugosidades y fragmentaciones severas causadas por la biodegradación a modo de erosión superficial (**Figura I.7**) pueden causar hinchamiento y relajación de todo el material facilitando la difusión de agua y solubilizando productos y fragmentos en el medio que rodea la muestra. Estos resultados se han obtenido en varios trabajos (Fontanella, S. y cols. 2010) en los que se emplean diferentes condiciones y microorganismos, (Kapri, A. y cols. 2010; Konduri, M.K.R. y cols. 2011) por ejemplo, bacterias como las mencionadas anteriormente o *Pseudomonas aeruginosa* (Jakubowicz, I. 2003), *Arthrobacter paraffineus* (Albertsson, A.C. y cols. 1995; Albertsson, A.C. y cols. 1998), *Rhodococcus ruber* (Orr, I. G. y cols. 2004) o consorcios de hongos (Zahra, S. y cols. 2010; Volke-Sepulveda, T. y cols. 2002; Bonhomme, S. y cols. 2003), también en condiciones de compostaje a 50°C (Greene, J. 2007). Los microorganismos y sus enzimas no solo interactúan directamente con el sustrato, sino que también producen especies reactivas de oxígeno (**ROS**) tales como superóxidos (Morpeh, F. 1985), radicales peróxido (Shen, J. y cols. 1996), radicales hidroxilo (Tanaka, H., y cols. 1999) y radicales derivados de compuestos generados en su metabolismo (Kapich, A. N. y cols. 1999; Ruiz-Dueña, F. J. y cols. 2001) y que sirven, por su fácil difusión, de mediadoras del proceso oxidativo (Morpeh, F. 1985). También en este Trabajo, mediante medidas de quimioluminiscencia se ha podido estudiar la oxidación que producen estas especies reactivas de oxígeno, ROS, en el polietileno biodegradado, al igual se observó en gelatinas (Abrusci, C. y cols. 2004a) y triacetato de celulosa (Abrusci, C. y cols. 2009) biodegradados.

En el proceso de biodegradación, algunos autores han observado la disminución de las especies de oxidación presentes en el polietileno degradado (Reddy, M.M. y cols. 2009), hecho que puede atribuirse a la preferencia de asimilación microbiana por los ésteres y compuestos carbonílicos que se forman en la degradación abiótica (Hakkarainen, M. y cols. 2004; Roy, P.K., y cols. 2011a y b; Chiellini, E. y cols. 2002; Jakubowicz, I. y cols. 2006). El mecanismo de biodegradación para los fragmentos oxidados de PE propuesto por Albertsson (Albertsson, A.C: y cols. 1987; Hakkarainen y cols. 2004) y basado en lo que ocurre en la biodegradación de parafinas se muestra en la **Figura I.8**.

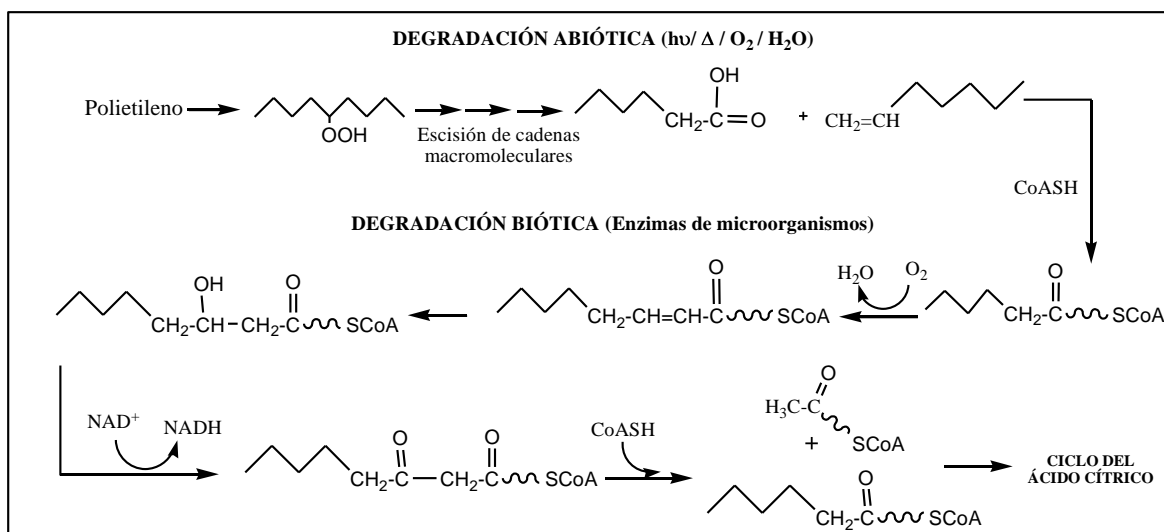


Figura I.8: Mecanismo de biodegradación del polietileno degradado abióticamente.

En la **figura I.8**, se muestran ambas fases de la oxi-biodegradación, abiótica y biótica, donde los fragmentos de bajo peso molecular oxidados son similares a parafinas y experimentan la biodegradación microbiana, que disminuye el número de carbonilos del material por formación de ácidos carboxílicos que reaccionan con el coenzima A (CoA) y se elimina un fragmento de dos carbonos, generando acetil-coenzima, que a su vez entra en el ciclo del ácido cítrico en el que la mineralización se produce generando dióxido de carbono y agua como productos finales. En este Trabajo la fase abiótica ha consistido en un tratamiento fotoquímico acelerado con luz artificial y en algunos casos se ha estudiado el tratamiento térmico y la degradación natural a la intemperie, en este último caso para confirmar la correlación de la degradación.

En la segunda fase del mecanismo de oxi-biodegradación, degradación biótica, es de vital importancia y así se ha hecho en este Trabajo, el aislamiento a partir del medio de aplicación del material, en nuestro caso un campo de cultivo de la Región de Murcia, y la posterior identificación de los microorganismos capaces de colonizar la superficie del filme agrícola de acolchado. Para ello se expusieron fragmentos de filmes en el campo de cultivo y después de 30 días se procedió al protocolo de aislamiento e identificación por métodos de biología molecular de las bacterias que fueron capaces de adherirse a los materiales.

Por otra parte, además de las bacterias aisladas en este Trabajo, se ha extendido el estudio empleando la bacteria *Brevibacillus borstelensis*, ya que en 2005 Haddad y

cols., demostraron que esta bacteria es capaz de utilizar el polietileno como única fuente de carbono. En 30 días a 50°C, esta bacteria disminuyó el peso molecular de un polietileno fotodegradado un 30% y el peso del material en un 11%. *B. borstelensis* también fue capaz de actuar sobre el polietileno no irradiado pero en mucha menor extensión.

A lo largo de toda la Memoria se incluye la bibliografía correspondiente con numeración correlativa. También se ha optado por la nomenclatura IUPAC de los productos y el empleo de códigos para designar los productos objeto de estudio. Asimismo, para los polímeros empleados se han utilizado los acrónimos internacionales en inglés.

Con la finalidad de lograr una claridad suficiente a la hora de exponer el Trabajo realizado, el contenido de esta Memoria se ha estructurado en Capítulos, de los que el primero de ellos se corresponde con los antecedentes relativos al campo de estudio. En el segundo Capítulo se describirán los *Objetivos* concretos planteados en esta Tesis; en el Capítulo tercero se describirán los *Materiales utilizados* y las *Técnicas instrumentales* y *Metodologías* empleadas para llevar a cabo todas las medidas experimentales. El Capítulo cuarto es el correspondiente a *Resultados*, que está dividido en los apartados de Aislamiento bacteriano, degradación abiótica: fotoquímica y térmica de filmes de polietileno y de copolímeros etileno-acetato de vinilo (EVA) con estearatos de Ca, Fe, Co y Mn como aditivos pro-oxidantes, así como, el estudio de la biodegradación microbológica de polietilenos, que incluye el estudio de la formación de biofilmes, bioasimilación de productos de bajo peso molecular y mineralización por determinación de dióxido de carbono por medidas indirectas de impedancia.

El Capítulo quinto, recoge la *Discusión* de los resultados obtenidos en los apartados mencionados anteriormente. Por último, en el capítulo sexto, se resumen las *Conclusiones* más relevantes del Trabajo.

Se concluye con el listado de *Referencias* en orden alfabético de primer autor y dos Anexos. En el *Anexo I* se recoge la información reseñada en el capítulo de Resultados como información adicional. En el *Anexo II* se incluyen las tres publicaciones SCI que

este Trabajo ha dado lugar hasta la fecha, aunque los resultados con los pro-oxidantes de cobalto y manganeso están pendientes de publicación.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este Trabajo es el estudio de Biodegradación Medioambiental de materiales basados en poliolefinas para contribuir a la eliminación de materiales de acolchado agrícola en el campo de cultivo después de su vida útil, mediante la combinación de las degradaciones abiótica y biótica “in situ”. Los objetivos parciales del Trabajo se enumeran a continuación:

II.1. Abordar el estudio de la Biodegradación Medioambiental, abiótica y biótica, de filmes agrícolas para el acolchado (25 micras), desarrollando una metodología de estudio que permita evaluar la biodegradación real de los diferentes materiales y comparar sus propiedades. Para este objetivo, es fundamental el aislar e identificar las cepas bacterianas que se adhieran y/o colonicen los filmes de acolchado en condiciones reales de utilización en un campo de cultivo (Murcia, España).

II.2. Estudiar el efecto de la incorporación de aditivos pro-oxidantes a la formulación de polietileno, y comparar el efecto del metal en la degradación abiótica (fotoquímica y térmica), así como, su posterior influencia en la biodegradación. Para ello, el primer paso de este objetivo fue la síntesis de productos pro-oxidantes estearatos de hierro, cobalto y manganeso por no ser comerciales, aunque también se incorporó al estudio el estearato de calcio comercial sin precedente bibliográfico como oxidante.

II.3. Estudiar la influencia de la estructura del polímero base del filme de acolchado en la biodegradación medioambiental, considerando la diferente naturaleza de las ramificaciones (LDPE y LLDPE) y la influencia de la presencia de un co-monómero polar como es el acetato de vinilo (copolímeros EVA).

II.4. Estudiar y comparar la biodegradación bacteriana de los materiales, iniciales y abióticamente degradados, con las bacterias aisladas en el trabajo, estudiando la formación de biofilmes, la bioasimilación de productos de bajo peso molecular y, por último, la mineralización de los materiales. Como referencia en este Trabajo se ha empleado la bacteria *Brevibacillus borstelensis*.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.1. Polímeros y Productos químicos empleados en el Trabajo.

Polímeros

Se han utilizado polímeros fabricados y suministrados por la empresa REPSOL:

LDPE, grado comercial PE-033 (Índice de fluidez 0.3 g/10 min.; densidad a 23°C 0.922 g/cm⁻³; resistencia a la tracción en rotura 21 MPa; alargamiento a la rotura 550 %; Temperatura Vicat 94°C; pesos moleculares promedio en número $M_n = 17230$, en peso $M_w = 73150$ y razón de polidispersidad PD = 4.3).

LLDPE, copolímero de etileno con 1-hexeno, grado experimental de polietileno de baja densidad (0.936 g/cm⁻³) con ramificación controlada para uso agrícola (pesos moleculares promedio en número $M_n = 38\ 400$, en peso $M_w = 94300$ y razón de polidispersidad PD = 2.4).

EVA, copolímero de etileno con acetato de vinilo con un contenido de 9% en acetato de vinilo, grado comercial PA-530 (Índice de Fluidez 0.3 g/10 min; densidad 0.932 g/cm⁻³; resistencia a la tracción en rotura 27 MPa; Alargamiento en rotura 510 %; Temperatura Vicat 81 °C; pesos moleculares promedio en número $M_n = 11060$, en peso $M_w = 87700$ y razón de polidispersidad PD = 7.9).

Estos materiales contienen un paquete estándar de estabilizantes de procesado (fenol-fosfito: Irganox 1010-Irgafos 168).

Productos químicos: Reactivos y disolventes

ALDRICH: Ácido esteárico 95 % (CAS 57-11-4), acetato de hierro (II) 99,99 % (CAS 3094-87-9), acetato de cobalto (II) 99,99 % (CAS 71-48-7), acetato de Manganeso (II) 98 % (CAS 638-38-0), estearato de Calcio 6,6-7,4 % (CAS 1592-23-0), dihidrógeno-fosfato de amonio (NH₄H₂PO₄) 98+ % (CAS 7722-76-1), hidrógeno-fosfato potásico (K₂HPO₄) >98 % (CAS 7758-11-4), cloruro de zinc (ZnCl₂· 2H₂O) >98 % (CAS 7646-85-7), sulfato de manganeso (II) heptahidratado (MnSO₄·7H₂O) 99 % (CAS 10034-96-5).

PANREAC: Hidróxido sódico (Pellets, CE 215-185-5), cloroformo (Chromasolv Plus, 99,9 %), cloruro de sodio (NaCl) (CE 231-598-3).

SCHARLAU: Sulfato de magnesio (MgSO₄·7H₂O) (CAS 7487-88-9), Triptona y Soja Agar (TSA).

Qemical Q: Sulfato de sodio anhidro (NaSO₄) (CE 231-820-9).

Micra: Cloruro de calcio anhidro 95 % (CaCl₂).

III.2. Síntesis de aditivos pro-oxidantes.

Por no ser comerciales, los aditivos pro-oxidantes han sido sintetizados en este Trabajo siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (Osawa, Z. y cols. 1968 y 1979; Grant, M. 1991). Las reacciones de síntesis se muestran en la **Figura III.1**.

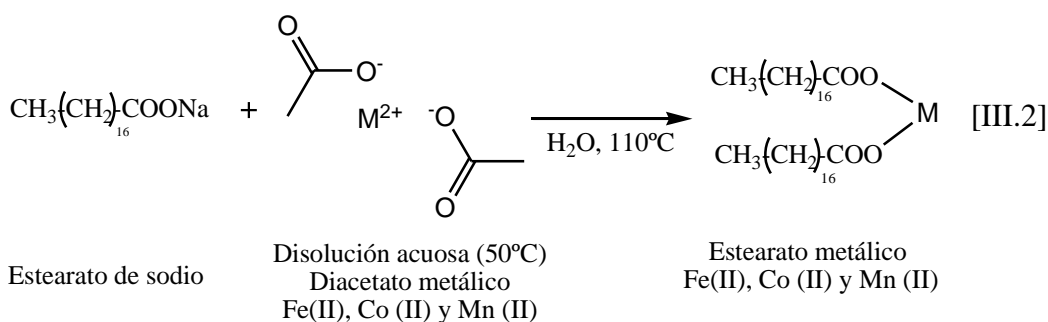
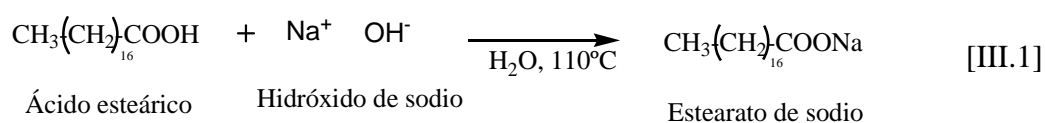


Figura III.1: Reacciones de síntesis de estearatos metálicos.

Para la obtención de los diferentes estearatos de metales de transición, se ha utilizado como producto de partida ácido esteárico, que por tratamiento con hidróxido sódico forma el estearato de sodio [III.1] y que, en un segundo paso, intercambia el catión en presencia de acetatos de metales de transición [III.2]. En este Trabajo se han sintetizado

los estearatos de Fe^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} . También se ha incorporado al estudio el producto comercial estearato de calcio de la firma Aldrich.

Procedimiento operatorio: Se disuelve el ácido esteárico (3 g.) en una disolución acuosa de hidróxido sódico (3 g. en 100 ml) que se mantiene a 110°C , enfriando posteriormente hasta obtener el estearato sódico como precipitado blanco y esponjoso que se separa. Posteriormente, a una disolución acuosa de estearato sódico a 110°C se añade la disolución acuosa, también caliente a 50°C del correspondiente diacetato de metal de transición, precipitando de esta forma en cada reacción los diferentes estearatos de Fe^{2+} (color marrón-amarillento claro), Co^{2+} (azul-violeta), Mn^{2+} (rosa pálido granulado). El estearato de Ca^{2+} es un sólido de color blanco. En todos los casos los precipitados se aislaron y secaron hasta peso constante.

Los productos obtenidos se caracterizaron empleando diferentes técnicas (FTIR, DSC y Análisis Elemental) e identificándose como los productos deseados. Por espectroscopia de FTIR-ATR se confirmó la formación del estearato de sodio y la completa sustitución de los cationes sodio. Desaparece la banda de tensión de grupo carbonilo de ácido a 1698 cm^{-1} del ácido esteárico y se observa la aparición de las bandas características de carboxilato, tensiones asimétrica y simétrica a 1556 cm^{-1} y 1468 cm^{-1} respectivamente, lo que confirma la formación de los estearatos (Luo, X. y cols. 1994). Los resultados de composición a partir del análisis elemental confirman los productos obtenidos, los valores se muestran en la **Tabla III.1** junto a los puntos de fusión determinados por calorimetría diferencial de barrido y que son coincidentes con los reseñados en la bibliografía (Roy, P.K. y cols. 2009).

Tabla III.1: Datos de análisis elemental (experimentales y teóricos) y puntos de fusión determinados por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de los estearatos.

Producto	%C		%H		%O		% Metal		T_m (DSC)
	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	Exp.	Teor.			
Ac. Esteárico	77,16	75,92	13,50	12,65	9,34	11,24	--	--	71
Estearato Co (II)	67,24	69,12	11,67	11,20	11,14	10,24	9,95	9,44	119
Estearato Mn(II)	67,63	69,57	11,99	11,27	11,06	10,31	9,32	8,86	116
Estearato Fe (II)	67,46	69,45	11,86	11,25	11,18	10,29	9,50	9,00	177
Estearato Ca (II) (a)	70,29	71,29	11,12	11,54	11,36	10,54	7,23	6,63	149

(a) producto comercial

III.3. Preparación de los filmes agrícolas de acolchado.

Los filmes de acolchado utilizados en este Trabajo fueron obtenidos mediante procesos de extrusión y soplado en el Centro Tecnológico de Repsol en Móstoles (Madrid). En primer lugar se procedió a una operación de mezclado en extrusora de la granza virgen de los polietilenos con los aditivos. Los estearatos metálicos sintetizados se mezclaron en una proporción de 0,2 % en peso con respecto al polietileno empleando un dosificador gravimétrico. Durante la etapa de mezclado los componentes de la formulación (polímero base y aditivos pro-oxidantes) son alimentados a una extrusora de doble husillo donde tiene lugar la fusión, dispersión y transporte de los componentes de la formulación para dar lugar a un perfil extruido del compuesto que se trocea en forma de granza. Las granzas preparadas conteniendo pro-oxidantes se guardaron en nevera (-4 °C) hasta la segunda etapa de preparación de filmes, que se llevó a cabo por extrusión y soplado. A título ilustrativo en la **Figura III.2** se muestran las máquinas de procesado mencionadas.

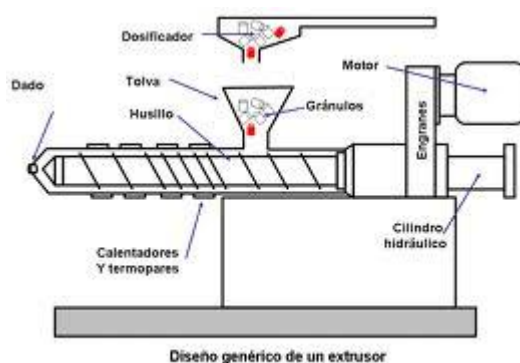


Figura III.2: Detalle de un extrusor genérico (Izq.) y de un dispositivo de extrusión y soplado (Dcha.).

La producción de las formulaciones se ha llevado a cabo a 2 kg/h en un equipo extrusor cuya capacidad puede variar entre 2 y 30 kg/h y cuya línea se compone, de un equipo dosificador gravimétrico de los componentes de la formulación (en nuestro caso, polímero base y aditivo pro-oxidante 0,2 % en peso), y una extrusora de doble husillo que suministra un perfil cilíndrico extruido de 2 mm de diámetro, un baño de enfriamiento y una granceadora.

La obtención de los filmes a partir de las formulaciones preparadas se realizó con un equipo convencional de extrusión y soplado; esta etapa contribuye de manera decisiva en la morfología final del filme, determinada por las condiciones de la extrusión y relación de soplado. Se obtuvieron de esta forma filmes de 25 μm de espesor uniforme.

La nomenclatura usada en esta Memoria para los materiales utilizados, es el acrónimo del polímero base del material seguido del metal que se adiciona en forma de estearato. Esta nomenclatura se ha mantenido en las publicaciones a que este Trabajo ha dado lugar (**Anexo II**).

III.4. Degradación abiótica: exposición a la intemperie, envejecimiento fotoquímico acelerado y tratamientos térmicos.

III.4.1. Exposición a la intemperie.

Es de gran utilidad dentro del campo de los filmes agrícolas de acolchado el estudio de la correlación existente entre el tiempo de uso de un material y su envejecimiento, tanto en condiciones climatológicas reales como de envejecimiento acelerado. En algunos casos, en este Trabajo se ha estudiado el comportamiento de los materiales en condiciones climatológicas reales, bajo las normas *ASTM G 7-99*, *ASTM D 1435-99* y *ASTM D 5272-92*.

La exposición de los filmes se ha realizado empleando un soporte portamuestras de duraluminio situado en la azotea del Centro de Química Orgánica M. Lora-Tamayo (Madrid, 40°21'N, 3°41'O) con una inclinación de 45°, orientación Sur y, tal como recomienda la norma, a más de 1 metro sobre el nivel del suelo. Simultáneamente a la exposición se ha determinado la energía solar incidente sobre los materiales mediante un radiómetro KIPP & ZONEN modelo *Solarimeter Integrator CC2* situado al lado del bastidor portamuestras. Este radiómetro registra la energía solar acumulada entre 300 y 3000 nm. En la **Figura III.3** se muestra el bastidor y el radiómetro empleado junto con la energía total acumulada en las nueve semanas de ensayo en exteriores.

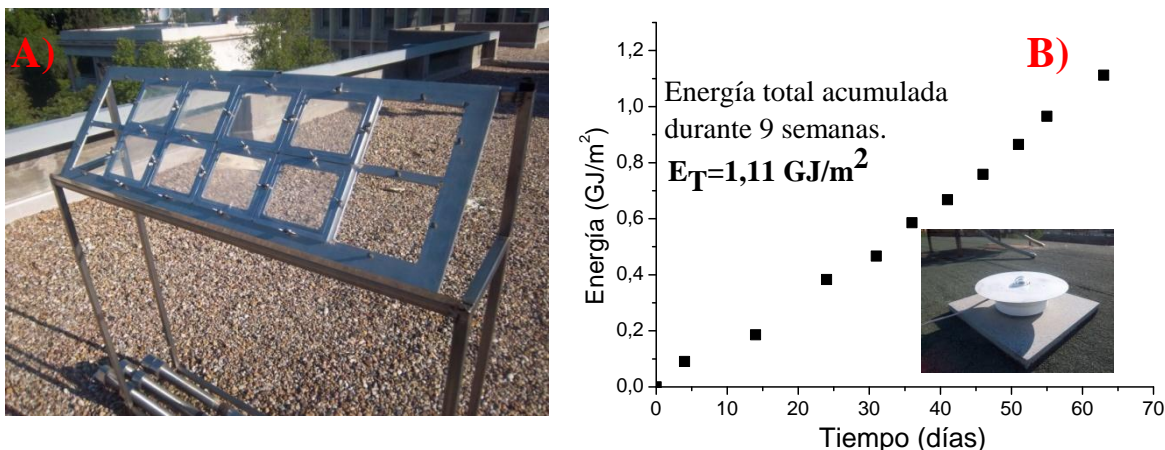


Figura III.3: Detalle del soporte portamuestras utilizado (A). Energía solar total acumulada durante el periodo de exposición a la intemperie (9 semanas) y detalle del radiómetro utilizado (B).

III.4.2. Envejecimiento artificial acelerado.

La degradación fotoquímica acelerada de los filmes se ha llevado a cabo con un equipo de envejecimiento acelerado modelo *ATLAS/SUNTEST XLS*, equipado con una lámpara de xenón tipo *ATLAS* de 2500 W como fuente de irradiación, manteniendo constante el valor de irradiancia en 550 W/m² (entre 300 y 800 nm). El sistema de irradiación además está provisto de un filtro de borosilicato que simula la radiación solar en exteriores, eliminando la radiación por debajo de 290 nm. Los filmes se irradiaron hasta 500 horas, dependiendo de los materiales. La equivalencia de exposición en el *SUNTEST* en estas condiciones con respecto al envejecimiento natural en exteriores es de 3-5 veces en verano dependiendo de la zona geográfica.

III.4.3. Tratamientos térmicos.

La degradación térmica de los materiales se realizó en una estufa de temperatura programable y que se mantuvo a temperatura constante en función del experimento realizado (45 °C, 55 °C, 60 °C, 70 °C y 90 °C). Las muestras fueron colocadas en los

portamuestras descritos anteriormente y los materiales se estudiaron por diversas técnicas periódicamente tomando las muestras necesarias en el caso de análisis destructivos.

III.5. Biodegradación. Valoración de dióxido de carbono por medidas indirectas de impedancia.

Los estudios de biodegradación se han llevado a cabo en un Biómetro Bac.Trac 4300 (SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkerdorf, Austria), mediante el método de medida indirecta de impedancia, que consiste en la valoración del dióxido de carbono procedente del metabolismo microbiano al mineralizar las muestras.

El equipo utilizado consta de varios compartimentos individuales con electrodos en los que se colocan los reactores de medida formados por un *recipiente exterior de valoración* provisto de electrodos con tapón para su cierre hermético, donde se dispone 1,5 ml de disolución de hidróxido potásico (KOH) de concentración 0,2 % en agua MilliQ. En su interior, se coloca el *recipiente de biodegradación*, que contiene los siguientes elementos: un gramo de sílice micronizada estéril de composición conocida, muestra a biodegradar consistente en 6 discos de 4 mm de diámetro (obtenidos mediante troquelado a partir de los filmes) y 1,5 ml de inóculo bacteriano. Los experimentos se han realizado a dos temperaturas, 30°C y 45°C para los diferentes polietilenos. En el caso del copolímero EVA, se realizó solamente a 45°C. El conjunto descrito se muestra en la **Figura III.4**.

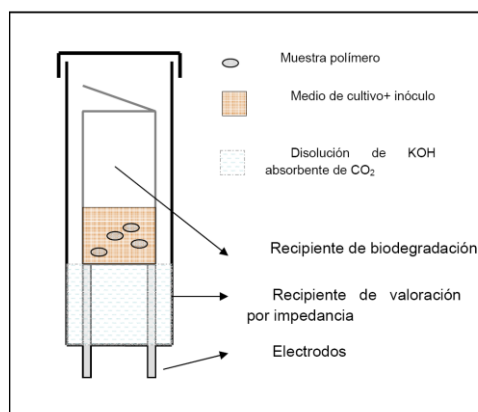


Figura III.4: Detalle de un recipiente de medida de impedancia.

Las suspensiones bacterianas para los inóculos se prepararon manteniendo un valor constante de Densidad Óptica, $DO^{550} = 0,2$ en Medio Mínimo (MM) carente de fuente de carbono. Todas las suspensiones contenían aproximadamente 2.5×10^8 células/ml, ya que la población microbiana se estimó mediante las concentraciones promedio determinadas por el método estándar de turbidez de McFarland (Murray, P.R. y cols. 1995) para la *D.O.* fijada.

Composición del MM:

Fosfato amónico $NH_4H_2PO_4$ 8 g; Fosfato ácido de potasio, K_2HPO_4 2 g; Sulfato de magnesio, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g; Sulfato sódico Na_2SO_4 0.5 g; Cloruro de Zinc $ZnCl_2 \cdot 2H_2O$ 8 mg, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8 mg, Sulfato de Hierro (II) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg; Cloruro Cálcico, $CaCl_2$ 0.05 g; Agua destilada 1000 ml y pH neutro.

La técnica de valoración de dióxido de carbono por medidas indirectas de impedancia, relaciona los cambios de impedancia al variar la concentración de hidroxilos por absorción de dióxido de carbono producido en el metabolismo microbiano. La concentración de hidroxilos se reduce por formación de carbonato, disminuye así la conductividad y, en consecuencia, aumenta la impedancia (**Reacción III.3**).



Los cambios producidos en el medio resultantes de la actividad metabólica de los microorganismos al biodegradar el material, se miden a partir de la producción de CO_2 que se absorbe en la disolución de valoración con KOH. La medida indirecta de impedancia para la valoración del CO_2 metabólico tiene mucha sensibilidad (Abrusci, C. y cols. 2007b) y permite correlaciones con la biodegradación de la muestra. Para ello, previamente se han obtenido curvas de calibrado obtenidas mediante medidas simultáneas de impedancia y de pH-conductimetría a diferentes tiempos, obtenidas con el sistema abierto al aire (CO_2 atmosférico). Las medidas de pH-conductividad en este Trabajo se han medido con un electrodo InLab[®] Micro Ref. 51343160 de la firma Mettler Toledo acoplado a un equipo portátil *pIONeer 45 pH-meter* de la firma Radiometer Analytical.

Las correlaciones aplicadas para determinar el dióxido de carbono a partir de la impedancia se muestran en la **Figura III.5**.

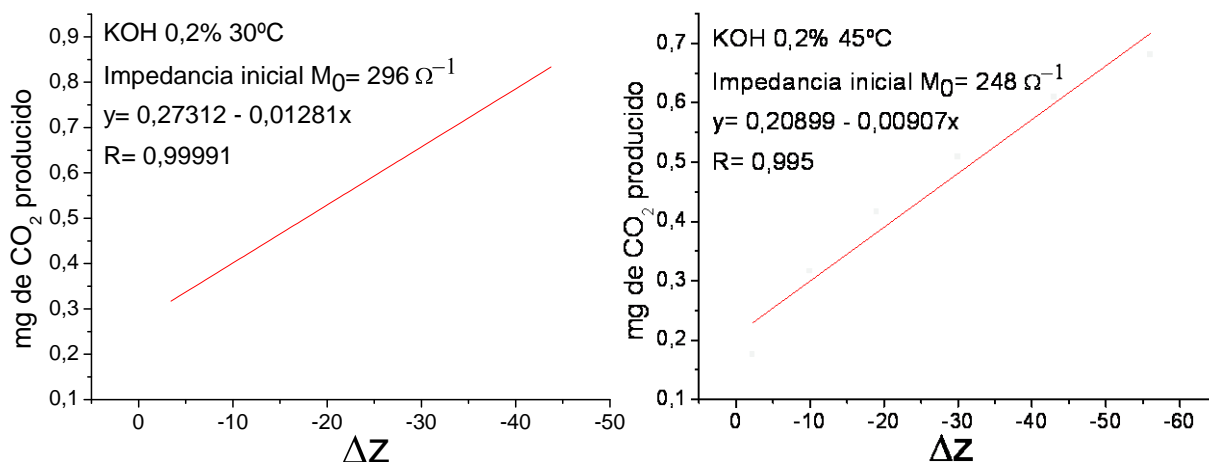
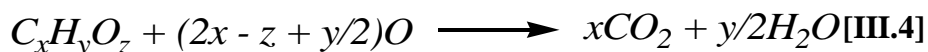


Figura III.5: Correlaciones a 30°C y 45°C entre la cantidad de CO₂ (mg) producido y la variación de impedancia media en tanto por ciento (% Δz), empleando para la valoración 1,5 ml de disolución 0,2% de KOH.

Las ecuaciones químicas generales de mineralización (Yakabe, I. y cols. 1994; Matsumura, S. y cols. 1994) permiten el cálculo de la cantidad de CO₂ teórico en la biodegradación de un producto orgánico. En la **reacción [III.4]** se muestra la mineralización correspondiente a un producto formado por C, H y O.



Con la ecuación de mineralización particularizada para los polietilenos se puede calcular el dióxido de carbono teórico a 100 % de mineralización según el peso de muestra introducido en el recipiente de biodegradación. El porcentaje de biodegradación de la muestra en un tiempo t se calcula por la relación entre la cantidad acumulada de CO₂ y el CO₂ teórico según la expresión, % Biodegradación = [CO₂]*100 / [CO₂]_{teórico}

III.6. Métodos y Procedimientos microbiológicos.

III.6.1. Aislamiento de cepas bacterianas.

El aislamiento de las cepas bacterianas se llevó a cabo a partir de los diferentes polietilenos, iniciales y fotodegradados, estudiados en este Trabajo. Los fragmentos (2 x 10 cm) se enterraron en tierras de cultivo de la Estación Experimental del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario (IMIDA). Los filmes permanecieron enterrados durante un periodo de 30 días, simulando las condiciones de cultivo a que se someten los filmes de acolchado (temperatura, riegos diarios, etc.) al cabo del cual, se procedió al aislamiento.

Todo el procedimiento operatorio tuvo lugar en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar y usando guantes estériles desechables. Se cortaron los fragmentos procedentes de la exposición a la intemperie en tamaños de 2 x 2 cm, y se dispusieron en placas Petri, que contenían un medio general adecuado para el cultivo de bacterias heterótrofas. Para el aislamiento de bacterias se utilizó el medio agar-tripticosa-soja (TSA). Las placas se incubaron a 30 y 45°C y a diferentes tiempos, 24 y 48 horas (**Figura III.6**). La temperatura es un factor clave en este trabajo ya que el estudio de biodegradación de las muestras se realiza a 30 y 45 °C, por ser estas temperaturas las que se alcanzan en la aplicación agrícola. Cada una de las colonias obtenidas tras la incubación se aisló en una nueva placa Petri de TSA. A partir de dichos cultivos puros, se obtuvieron réplicas que fueron conservadas a -80 °C, usando caldo tripticosa-soja (TSB) suplementado con glicerol en proporción 2:3.

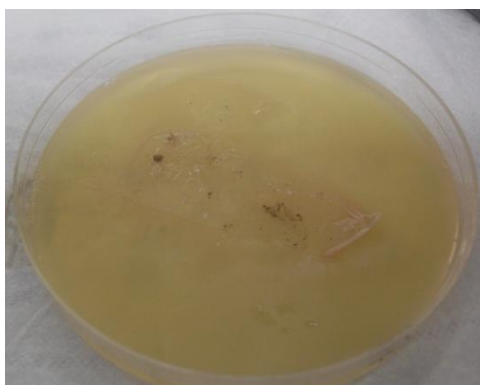


Figura III.6. Crecimiento bacteriano sobre un polietileno fotodegradado.

III.6.2. PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

Identificación de bacterias

Para la identificación de las cepas bacterianas obtenidas se extrajo su ADN genómico utilizando el kit de extracción PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO, Labs, Inc.) siguiendo el método descrito por la casa comercial. El ADN genómico extraído se conservó a -20 °C hasta su posterior utilización. Las amplificaciones del gen 16S ARNr de bacterias fueron llevadas a cabo en un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystem). Todas las reacciones de PCR contenían la siguiente mezcla de reacción (concentraciones finales para un volumen final de 50 µl):

- ❖ 5 µl del ADN obtenido mediante el kit PowerSoil®.
- ❖ 0,5 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂.
- ❖ 0,5 mM de cada uno de los cebadores:
 - 27F (5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3')
 - 1492R (5'-TAC GG(CT) TAC CTT GTTACG ACT T-3')
- ❖ 1x tampón de la enzima.
- ❖ 0,5 U/µl Taq ADN Polimerasa (AmpliTaq® DNA Polymerase Roche Molecular Systems).

El ciclo de amplificación del gen 16S ARNr bacteriano consiste en una incubación inicial de 5 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C y 3 minutos a 72 °C; y una elongación final de 10 minutos a 72 °C. Tras esta fase las muestras se mantienen a 4 °C para su conservación.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) al 1%, teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml). Para comprobar que los fragmentos obtenidos eran del tamaño correcto se utilizó un marcador de pesos moleculares (ADN de Ø29 digerido con Hind III). Las bandas correctas son las obtenidas en un tamaño aproximado de 1450-1460 pares de bases (**Figura III.7**).

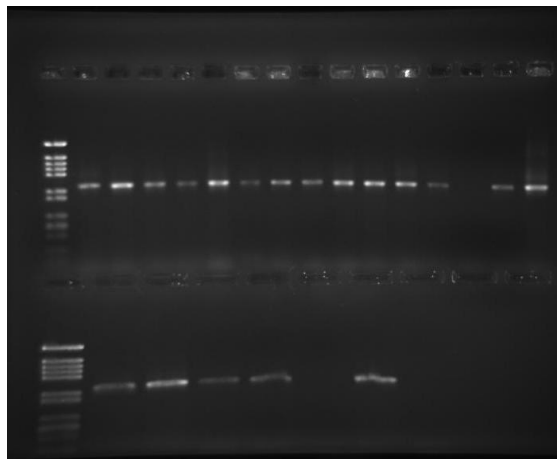


Figura III.7. Electroforesis de producto de PCR en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el JetQuick PCR® Product Purification Spin Kit (Genomed) y la cantidad de ADN presente en cada muestra fue determinada utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y el programa informático ND-1000 3.3. Tras la purificación, los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI) y el secuenciador ABI 310 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las disponibles en la base de datos de GenBank (National Center for Biotechnology Information) utilizando la herramienta algorítmica para alineamiento de secuencias Basic Local Alignment Search Tool o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar las secuencias de este trabajo con las secuencias con mayor similitud. Finalmente, las secuencias seleccionadas fueron alineadas con el programa CLUSTAL X (Thompson, J.D. y cols. 1997).

III.7. Técnicas instrumentales.

III.7.1. Análisis de emisión de quimioluminiscencia (QL).

El calentamiento de un polímero viene acompañado de una débil emisión de luz (quimioluminiscencia) producida como resultado directo de una reacción química (**Figura III.8**). Así se puede evaluar la estabilidad de los materiales poliolefínicos frente

a la oxidación y hacer mediciones de su estabilidad (Catalina, F. y cols. 2002a; Kron, A. y cols. 1996; Dudler, V. y cols. 1996; Peinado, C. y cols. 2002 y 2006).

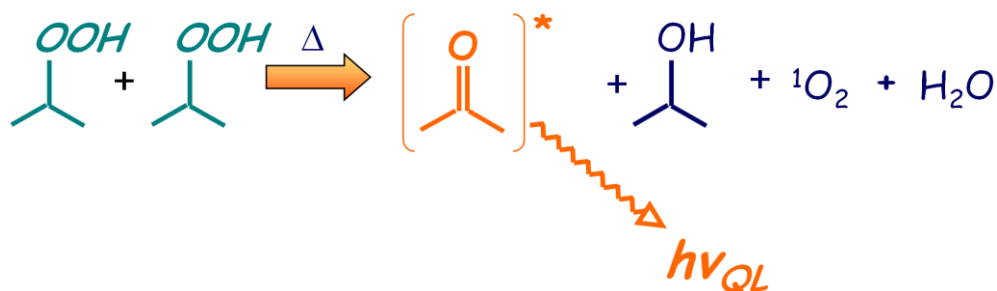


Figura III.8: Esquema emisión de quimioluminiscencia.

Los hidroperóxidos que se forman en el proceso de degradación de una poliolefina, pueden dar lugar vía térmica a una reacción de desproporción como la que se muestra en la **Figura III.8** y que da lugar a un alcohol, oxígeno singlete y a una especie cetónica en estado excitado triplete que puede desactivarse emitiendo una fosforescencia que denominamos Quimioluminiscencia por producirse a partir de una reacción química térmicamente inducida.

La intensidad de la emisión de quimioluminiscencia es proporcional a la concentración de especies de oxidación formadas durante la degradación del material, así será posible realizar un seguimiento de la eficiencia de los diferentes estearatos utilizados como aditivos pro-oxidantes (George, G.A. 1981).

El equipo utilizado ha sido un *CL400 ChemiLUME* de la firma Atlas Electric Devices Co. Las muestras se introducen en un horno de temperatura controlada cerrado con una lente óptica que focaliza la emisión de luz correspondiente a la muestra en un fotomultiplicador (Hamamatsu R1527P) refrigerado con agua a 19°C. La corriente de gas puede ser de oxígeno o nitrógeno y las medidas isotermas o dinámicas.

Dependiendo de la emisión de quimioluminiscencia esperada y para evitar la saturación del tubo fotomultiplicador, se puede seleccionar dos niveles de sensibilidad dependiendo del gas en el que hacemos la medida. En nitrógeno, seleccionaremos ganancia alta y en oxígeno, ganancia baja. Un esquema básico de la disposición de elementos para la medida de quimioluminiscencia se muestra en la **figura III.9**.

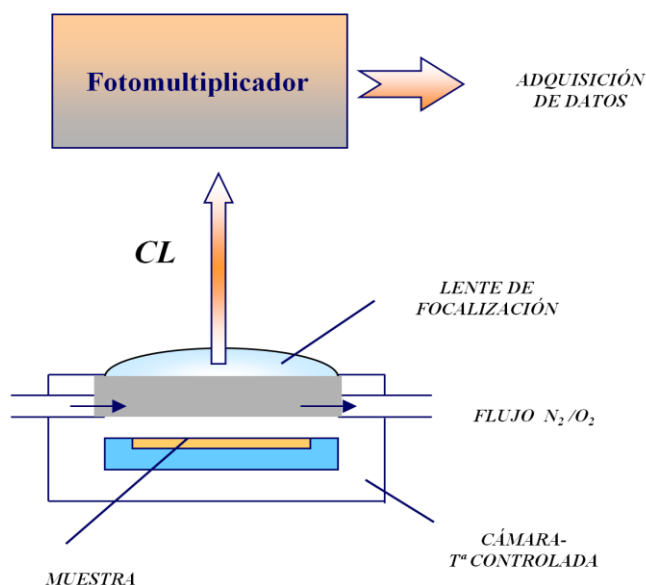


Figura III.9: Esquema de medida de la Quimioluminiscencia.

Las medidas realizadas son de dos tipos; medidas dinámicas, en las que se hace una rampa de temperatura con una velocidad de calentamiento de $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 30°C y 250°C bajo un flujo constante de nitrógeno y las medidas isotermales, en las que se calienta a una temperatura constante de 170°C en atmósfera de nitrógeno, si se analiza el estado de oxidación de la muestra, o de oxígeno, para oxidar drásticamente el material y ver su respuesta de emisión. Las muestras de filmes han sido discos circulares troquelados de tamaño comprendido entre 4 y 12 mm de diámetro dependiendo de la intensidad de las señales.

III.7.2. Espectroscopia infrarroja (FTIR-ATR).

El espectrofotómetro utilizado ha sido un equipo *PERKIN ELMER BX I FT-IR* con un accesorio de ATR MIRacleTM ATR de PIKE Technologies acoplado. Las condiciones utilizadas en las medidas fueron tanto en Transmisión como con ATR, en el intervalo de números de onda: $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, empleando una Resolución de 2 cm^{-1} y el registro de 32 barridos.

El grado de oxidación de los filmes se determinó mediante la medida de la absorbancia de grupos carbonilos, principalmente cetónicos (1714 cm^{-1}) (Reddy, M.M. y cols.

2008). Se ha utilizado en este Trabajo el índice de carbonilo (CI), para expresar los niveles de concentración de compuestos carbonílicos medidos FTIR-ATR. El CI se calculó de acuerdo con el método de línea base (Gulmine, J.V. y cols. 2003; Rodríguez-Vazquez, M. y cols. 2006) como la relación entre la densidad óptica de la banda de absorción del carbonilo a 1714 cm^{-1} , y la densidad óptica de la banda de absorción de metileno, en el caso de PE usando como referencia la banda de 1435 cm^{-1} (CH_2 “scissoring”) y en el caso del copolímero EVA se ha empleado la banda de 2850 cm^{-1} de deformación en el plano de metilenos como banda de referencia interna de espesor, $CI = DO (1714\text{ cm}^{-1}) / DO (\text{Ref. interna})$.

III.7.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) es un método térmico de análisis basado en la medida de la relación dinámica entre la temperatura y alguna otra propiedad de la muestra. La muestra y la referencia se someten a una variación programada de la temperatura, de forma que el calorímetro aporta el calor necesario para equilibrar la temperatura en ambos pocillos y compensar las variaciones que se producen como consecuencia de los procesos exotérmicos o endotérmicos que tienen lugar en la muestra. Así, mediante esta técnica se pueden seguir todos aquellos procesos relacionados con efectos térmicos (cambios entálpicos). Entre estos se incluyen, calor específico y entalpía como función de la temperatura, transformaciones físicas como fusión, cristalización y transiciones vítreas en polímeros, así como, reacciones químicas.

Para las medidas, la muestra y la referencia se someten a una variación programada de temperatura, desde 25°C a 180°C , con una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, en dos barridos de temperatura con un enfriamiento entre los dos calentamientos de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. El equipo fue calibrado con un estándar de Indio ($T_m=429\text{K}$ and $H_m=25.75\text{ Jg}^{-1}$), suministrado por el fabricante.

El calorímetro utilizado en las experiencias fue un *Mettler Toledo DSC 823^e* con un cargador de muestras Robot Sample-TS0801RO.

A partir de los termogramas obtenidos con los filmes de polietilenos se determinó la **cristalinidad** de los materiales (% χ). Para calcular la cristalinidad se relaciona la entalpía de fusión de la muestra (área bajo la curva correspondiente al pico de temperatura de fusión) y la entalpía de fusión teórica del polímero 100% cristalino, según la expresión, $\% \chi = \Delta H_f / \Delta H_{f(100\% \text{ Crist.})}$ que para el polietileno es $\Delta H_f=293 \text{ J/g}$ (Flory, P.J. y cols. 1963; Corrales, T. y cols. 2003).

También por DSC se ha determinado el **Tiempo de Inducción a la Oxidación (OIT)** que permite valorar la estabilidad térmica del polímero. Se ha calculado el OIT utilizando el método estándar (ASTM 3895-80, ISO 11357) (Catalina, F. y cols. 2002a, Corrales, T. y cols. 2003) consistente en realizar un calentamiento inicial en atmósfera de nitrógeno hasta 200°C, manteniéndolo así hasta estabilizar la línea base. Después manteniendo esa temperatura constante, se cambia a una atmósfera de oxígeno, tomando ese tiempo como tiempo inicial. El valor de OIT es el tiempo desde la exposición al oxígeno hasta que se pierde la linealidad de la línea base, “onset” de oxidación, y que corresponde con el comienzo de un proceso exotérmico. Esta medida proporciona información acerca de la estabilidad de los materiales frente a la termooxidación, así como de la influencia de los aditivos y su efecto pro-oxidante en los materiales utilizados.

III.7.4. Análisis termogravimétrico (TGA).

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que resulta de gran utilidad en el análisis de la estabilidad térmica de materiales polímeros. Se basa en el análisis de la variación del peso de una muestra en función de la temperatura (TGA dinámica). El aumento de temperatura por calentamiento de la muestra produce, en primer lugar, una pérdida de productos volátiles. A temperaturas superiores, se observa la pérdida de fragmentos de bajo peso molecular (productos de degradación). A temperaturas más altas tiene lugar la degradación térmica del polímero.

Los termogramas se obtuvieron con una termobalanza *PERKIN ELMER TGA 7* bajo atmósfera de nitrógeno, en condiciones dinámicas, manteniendo una velocidad constante de calentamiento de 10°C/min en el intervalo de temperaturas de 25°C hasta 700°C.

A partir del termograma se obtienen datos característicos del material: la temperatura de pérdida de peso de 10 % (T_{10}), que se ha tomado en este Trabajo como temperatura de inicio (*onset*), la temperatura a la que se alcanza el 50 % de pérdida de masa (T_{50}) y la temperatura de máxima pérdida de peso (T_{max}). El análisis de los termogramas obtenidos se realizó con el software de TA Q Series Advantage utilizando el programa Universal Analysis.

III.7.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La microscopía electrónica de barrido permite estudiar la morfología de los materiales y los cambios producidos en éstos debido a la degradación abiótica y biótica. En este Trabajo, se ha utilizado un microscopio electrónico de barrido *Philips XL 30* operando en modo convencional de alto vacío con un voltaje de aceleración de 25 kV. El haz de electrones se focaliza sobre la superficie de la muestra, realizándose barridos a lo largo de ella. Un detector recoge la señal de los electrones secundarios que emergen de la superficie, gracias a la cual se construye la imagen de la muestra. La cámara que contiene la muestra (además de la óptica del equipo) se mantiene a baja presión. Las micrografías se realizaron metalizando la muestra con un recubrimiento de 3 nm de espesor de aleación oro-paladio, material conductor que evita la acumulación de carga electrostática proveniente del haz de electrones.

Se obtuvieron así diferentes imágenes de las muestras iniciales, fotodegradadas y degradadas térmicamente, así como de los biofilmes formados por las bacterias en los materiales fotodegradados. También se empleó esta técnica para el estudio de las Bacterias.

III.7.6. Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS). Extracción de productos de bajo peso molecular.

El análisis de los fragmentos de bajo peso molecular obtenidos se hizo con un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 N* acoplado con un detector selectivo de masas modelo *5973 inert*. La separación cromatográfica se realizó mediante una

columna capilar de sílice fundida HP-5ms con la fase estacionaria de 5% poli(fenilmetilsiloxano) con un espesor de película de 250 μm . El gas de arrastre fue helio.

Para el análisis de los productos de bajo peso molecular producidos en la degradación de los filmes, se ha procedido a su extracción del material para después analizar empleando la técnica de GC-MS. Para la extracción los filmes se someten a un proceso de ultrasonificación (equipo Branson 2210), 5 mg de muestra en 10mL de cloroformo durante 2 horas con un baño de temperatura de 60°C. Se deja evaporar a temperatura ambiente y se redisuelve en 2 mL de cloroformo, adicionando 20 μL de disolución de naftaleno (1 g/l) utilizada como patrón interno. Se filtra con un filtro de PTFE de 0,2 μm de tamaño de poro y 17 mm de diámetro, obteniendo así un extracto cuyo contenido en fragmentos de bajo peso molecular va a variar en función del estado de degradación de la muestra.

Para las medidas por GC-MS, se inyecta 1 μL de extracto en el aparato. Las condiciones utilizadas en estas experiencias han sido, velocidad de calentamiento 5 °C/min, desde una temperatura inicial de 80°C (manteniendo ésta durante 3 minutos) hasta una temperatura de 250 °C (manteniendo ésta durante 30 minutos). La temperatura del horno al inyectar la muestra fue de 250 °C. Los productos de degradación fueron identificados comparando su espectro de masas con los espectros de la base de datos NTS Wiley 7n.

III.7.7. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC).

La cromatografía de exclusión de tamaños, SEC (también llamada cromatografía de permeación de geles, GPC) es una técnica de determinación de distribuciones y pesos moleculares que consiste en hacer pasar una disolución diluida de polímero a través de una columna rellena de un gel microporoso o microesferas de un polímero reticulado con diferentes niveles de tamaño de poro. Las moléculas de polímero pueden penetrar en los microporos del gel o avanzar entre las partículas de relleno de la columna en función de su tamaño, por lo que si se relaciona el tiempo de elución con el peso molecular a través de un calibrado previo se pueden obtener pesos moleculares

promedio y distribuciones. El análisis de la distribución de pesos moleculares de las muestras estudiadas, iniciales, fotodegradadas y biodegradadas se realizó en el Centro de Tecnología de Repsol en un PL-GPC 220, con detector de índice de refracción. La fase móvil fue 1,2,4-Triclorobenceno (TCB) con 2,6-di-ter-butil-4-metil fenol (0,015%) como antioxidante, con un flujo de 1mL/min y temperatura de 160°C. Los valores obtenidos fueron referenciados a una curva de calibrado universal con los siguientes parámetros viscosimétricos $K=3.95 \times 10^{-4}$ y $\alpha = 0.726$ para el polietileno.

III.7.8. Ángulo de contacto.

El ángulo de contacto viene dado por el ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido (Pierce, E. y cols. 2008). El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas líquido-sólido. Cuando las fuerzas adhesivas con la superficie del sólido, son muy grandes en relación a las fuerzas cohesivas, el ángulo de humectancia es menor de 90°, teniendo como resultado que el líquido “moja” la superficie del polímero ya que ésta es hidrófila (**Figura III.10**).

Un material plástico es más hidrófilo si se oxida y si existen sustancias de bajo peso molecular que presentan afinidad por el agua, por tanto con los procesos de degradación aumenta la hidrofilia de la superficie.



Figura III.10: Medida de ángulo de contacto para un material hidrófilo (Izq.) y un material ligeramente hidrófobo (Dcha.).

Las medidas de ángulo de contacto de los filmes se han determinado empleando agua (Milli-Q) como fase líquida y se han medido en un equipo CAM 2000 de KSV Instruments, provisto de cámara, dispensador automático de microgotas y software de captura y tratamiento de imágenes y datos. Así, se determinó la variación del carácter hidrofílico-hidrofóbico de la superficie de los filmes determinando el ángulo de contacto como promedio de cinco medidas independientes en cada caso y la tensión de adhesión de agua se calculó mediante la ecuación **[III.5]**.

$$\tau = \gamma \cos \theta \quad \text{[III.5]}$$

Donde θ es la tensión superficial del agua 72,8 dyn/cm.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS.

IV.1. Aislamiento e Identificación de bacterias adheridas a los materiales.

Para el aislamiento de las posibles cepas adheridas en los filmes de polietileno enterrados durante un periodo de 30 días en la Estación Experimental del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario (IMIDA) se siguió el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos **III.6.1**. Para ello se procedió al aislamiento de las cepas que se habían adherido a los filmes de polietileno iniciales (sin fotodegradar), y a los filmes fotodegradados (Abrusci, C. y cols. 2011). Después del periodo de incubación en las placas Petri (30 - 45°C) con los filmes de polietileno, se observó que los materiales sin fotodegradar no poseían cepas bacterianas adheridas a su superficie, en cambio en los fotodegradados se obtuvieron cepas bacterianas de tres tipos morfológicos diferentes.

Las bacterias aisladas de la superficie de los filmes utilizados, se identificaron a partir de la amplificación del gen 16S rRNA donde se siguió el protocolo indicado en el apartado de materiales y métodos **III.6.2** en esta Memoria.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml). Para comprobar que los fragmentos obtenidos eran del tamaño correcto se utilizó un marcador de pesos moleculares (ADN de Ø29 digerido con Hind III). Las bandas correctas son las obtenidas con un tamaño aproximado de 1450-1460 pares de bases (**Figura IV.1**).

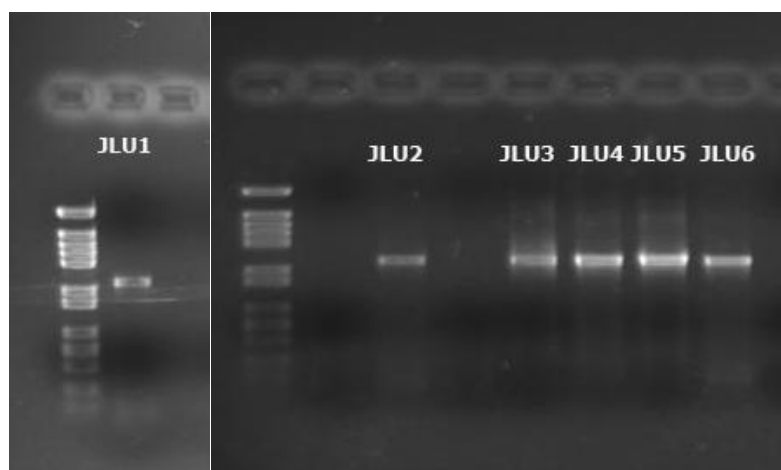


Figura IV.1: Electroforesis de producto de PCR en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

La asignación filogenética de las tres cepas aisladas se realizó en base a las similitudes de las secuencias de sus genes 16S rRNA con los existentes en el GenBank (National Center for Biotechnology Information). Las bandas secuenciadas de las tres cepas presentaron porcentajes de identidad igual o superior al 99 % con las secuencias de las especies de referencia. En la **tabla IV.1.** se recoge la identificación taxonómica y los porcentajes de identidad de cada cepa adherida a los filmes fotodegradados.

Tabla IV.1. Resultados de identificación de especies bacterianas.

Identificación Bacteriana	Cepa aislada	Organismo con mayor similitud en secuencia 16S ARNr (NCBI)	% Homología secuencia	Crecimiento	
				30°C	45°C
LDPE Fotodegradado	<i>Bacillus cereus</i>	GU269268.1 <i>Bacillus cereus</i>	100	+	+
	<i>Bacillus megaterium</i>	GQ927173.1 <i>Bacillus megaterium</i>	99	+	+
	<i>Bacillus subtilis</i>	GQ305125.1 <i>Bacillus subtilis</i>	100	+	+

Se obtuvo como resultado tres cepas bacterianas diferentes, con capacidad de colonizar la superficie de los filmes de acolchado fotodegradados, todas ellas Gram-positivas, del género *Bacillus*. Estas especies de *Bacillus* identificadas son muy comunes en la

naturaleza y se encuentran de forma habitual en suelos y vegetación. Son capaces de degradar un amplio rango de sustratos (Gibson, T. y cols. 1974; Claus, D. y cols. 1986) y el intervalo de temperaturas de crecimiento se puede considerar estable. Se ha demostrado que estos tres tipos de *Bacillus* pueden crecer en un intervalo de temperaturas entre 3-50°C (Warth, A.D., 1978) y que otros tipos de *Bacillus* tienen capacidad para biodegradar polietileno fotodegradado (Watanabe, T. y cols. 2009) así como otras especies (Song, Y. y cols. 2012).

Como ya se ha indicado anteriormente, la temperatura es un factor clave en la biodegradación de los materiales agrícolas, así el estudio se realiza a 30 y 45 °C, por ser temperaturas que se alcanzan en la aplicación agrícola y, por tanto, las más adecuadas para el estudio (Abrusci, C. y cols. 2011). Como se recoge en la **tabla IV.1.**, todas las cepas crecían en este intervalo de temperatura.

Además de las cepas adheridas, se llevó a cabo un estudio comparativo con *Brevibacillus borstelensis* (DSM-No 6347) debido a la capacidad de ésta en la biodegradación del polietileno (Hadad, D. y cols. 2005). En la **figura IV.2** se muestran las microfotografías de las cepas bacterianas con un microscopio electrónico de barrido (SEM).

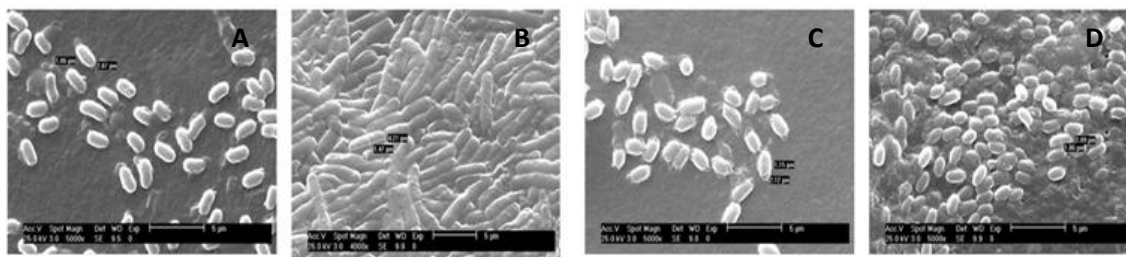


Figura IV.2: Imágenes de SEM de las diferentes cepas bacterianas utilizadas: (A) *Brevibacillus borstelensis*, (B) *Bacillus megaterium*, (C) *Bacillus cereus*, (D) *Bacillus subtilis*.

IV.2. Degradación fotoquímica y térmica.

Para el estudio de degradación de los filmes de polietileno preparados en este Trabajo, se procedió al estudio por separado de la degradación fotoquímica y de la degradación térmica. Además, los trabajos de fotodegradación se realizaron en dos fases; la primera comparando el estearato de calcio con el de hierro (**Apartado IV.2.1**), por ser el primero un pro-oxidante que como tal es nuevo en la bibliografía y para evaluar de modo comparativo el polietileno de baja densidad LDPE (de ramificación larga) con el lineal de baja densidad (LLDPE) de ramificación controlada (**Figura I.3. Antecedentes**), y la segunda donde se compara la actividad de los estearatos de Co y Mn con los de hierro y calcio en polietilenos de baja densidad (LDPE).

Después de la degradación fotoquímica, se abordó el estudio de la degradación térmica, solo efectiva a niveles de interés aplicado en los estearatos de Co y Mn; en este estudio (**Apartado IV.2.2**) también se incluyó el estearato de Fe y el LDPE como referencia. Por último, para observar la influencia de un co-monomero polar en el polietileno y por el gran interés que actualmente tienen los copolímeros de etileno-acetato de vinilo en la aplicación agrícola, se abordó el estudio de fotodegradación de un material de EVA de 9% de contenido en acetato de vinilo (**Apartado IV.2.3**). Veamos a continuación los resultados obtenidos en los diferentes estudios de degradación realizados.

IV.2.1. Degradación fotoquímica de filmes de polietileno con estearatos de Fe, Ca, Co y Mn.

En primer lugar se caracterizaron los materiales iniciales para determinar la influencia del grado de ramificación de los polietilenos utilizados (LDPE y LLDPE) y de la incorporación de los aditivos pro-oxidantes, estearato de hierro, calcio, cobalto y manganeso, en la degradación de los materiales durante la etapa de procesado. Mediante un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC), se ha determinado tanto la temperatura de fusión (T_m) como el grado de cristalinidad, X_c (%), a partir del pico correspondiente a la transición endotérmica de fusión obtenida (**Tabla IV.2**). Se han observado valores iniciales de temperatura de fusión y cristalinidad menores en el caso del polietileno de baja densidad (LDPE) respecto al lineal de baja densidad (LLDPE),

debido a su mayor grado de ramificación. Estos valores para los materiales iniciales variaron levemente tras la incorporación de los aditivos pro-oxidantes utilizados. La temperatura de fusión para el LDPE fue de 107°C, valor que aumentó ligeramente tras la incorporación de los aditivos pro-oxidantes (estearato de hierro y calcio); en el caso del LLDPE, el valor de temperatura de fusión obtenido fue de 123°C, observándose una pequeña disminución de ésta tras la incorporación de los estearatos. Para las muestras fotodegradadas se ha observado un incremento del grado de cristalinidad determinado de la misma forma por DSC (**Tabla IV.2**).

Tabla IV.2: Valores de temperatura de fusión (T_m) y de cristalinidad (% X_c) obtenidos mediante DSC de los materiales iniciales y fotodegradados.

Análisis DSC	Inicial		Fotodeg.	
	T_m (°C)	X_c (%)	T_m (°C)	X_c (%)
LDPE	107	19	112	25
LDPE-Fe	112	19	113	21
LDPE-Ca	113	21	114	25
LLDPE	123	25	123	27
LLDPE-Fe	115	24	116	28
LLDPE-Ca	116	25	117	28

La estabilidad térmica de las muestras se estudió mediante análisis termogravimétrico (TGA) (Velocidad de calentamiento 10°C/min, 25-700°C) en atmósfera de nitrógeno (Dobkowski, Z. 2006). Se obtuvieron curvas con una sola etapa de degradación, asociada a la ruptura al azar como etapa primaria en la degradación de polietileno. Se tomaron los datos de *onset* de temperatura de degradación a un 10% y un 50% de pérdida de masa (T_{10} y T_{50} respectivamente), así como la temperatura a la que se produce la máxima descomposición (T_{max}) (**Tabla IV.3**).

Observando los datos obtenidos para los materiales iniciales se aprecia una tendencia a la desestabilización en los materiales con estearatos en comparación con los materiales puros. Se produce una disminución en los valores de T_{10} , T_{50} y T_{max} , lo que indica la naturaleza pro-oxidante de los estearatos durante el procesado, siendo este efecto más acusado en el material con mayor grado de ramificación (LDPE), en el que está más favorecida la abstracción de átomos de hidrógeno que dará lugar a la ruptura de las cadenas poliméricas.

Tabla IV.3: Temperatura de pérdidas de peso 10 % y 50 % obtenidas mediante TGA.

Análisis de TGA	T_{10} (°C)		T_{50} (°C)		T_{max} (°C)	
	Inicial	Fotodeg.	Inicial	Fotodeg.	Inicial	Fotodeg.
LDPE	456	437	485	474	490	480
LDPE-Fe	431	381	474	470	480	480
LDPE-Ca	417	368	477	470	486	482
LLDPE	458	445	486	478	491	481
LLDPE-Fe	454	403	482	476	485	484
LLDPE-Ca	453	446	482	479	487	483

El análisis de emisión de quimioluminiscencia de forma dinámica en atmósfera de nitrógeno para las muestras iniciales constituye una herramienta muy útil (Zlatkevich, L. 1985) para evaluar la actividad de los estearatos como aditivos pro-oxidantes durante el procesado de los materiales. Se han obtenido las curvas de emisión de quimioluminiscencia para los materiales iniciales (**Figura IV.3**), en ausencia (LDPE y LLDPE) y en presencia de aditivos pro-oxidantes (LDPE-Fe, LDPE-Ca, LLDPE-Fe y LLDPE-Ca). Los resultados obtenidos muestran una mayor emisión de QL en LDPE respecto a LLDPE en todo el intervalo de temperaturas, que indica una mayor concentración de hidroperóxidos, lo que pone de manifiesto una mayor actividad del estearato de Ca y Fe en ambos materiales, que se refleja en un desplazamiento de la emisión a menores temperaturas en presencia de estos pro-oxidantes.

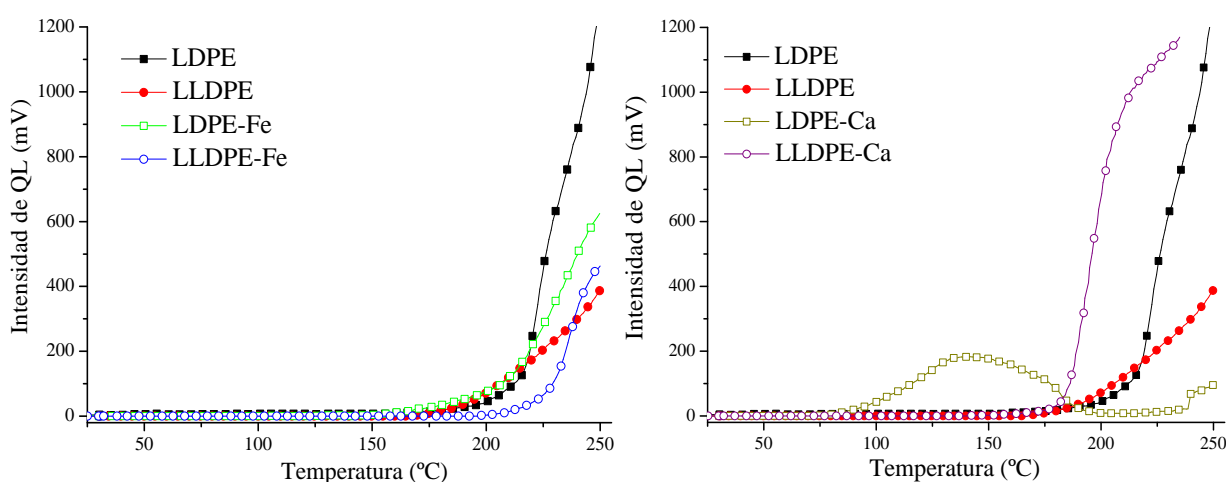


Figura IV.3: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para los materiales iniciales.

Filmes de las distintas muestras han sido sometidos a exposición a la intemperie durante un período de 9 semanas, y se ha analizado la degradación abiótica de los polietilenos mediante análisis dinámico de emisión de quimioluminiscencia en atmósfera de nitrógeno (**Figura IV.4**). En general, para todos los materiales degradados se observa un aumento de la emisión de QL y desplazamiento del *onset* de emisión a menores temperaturas en comparación con los materiales iniciales.

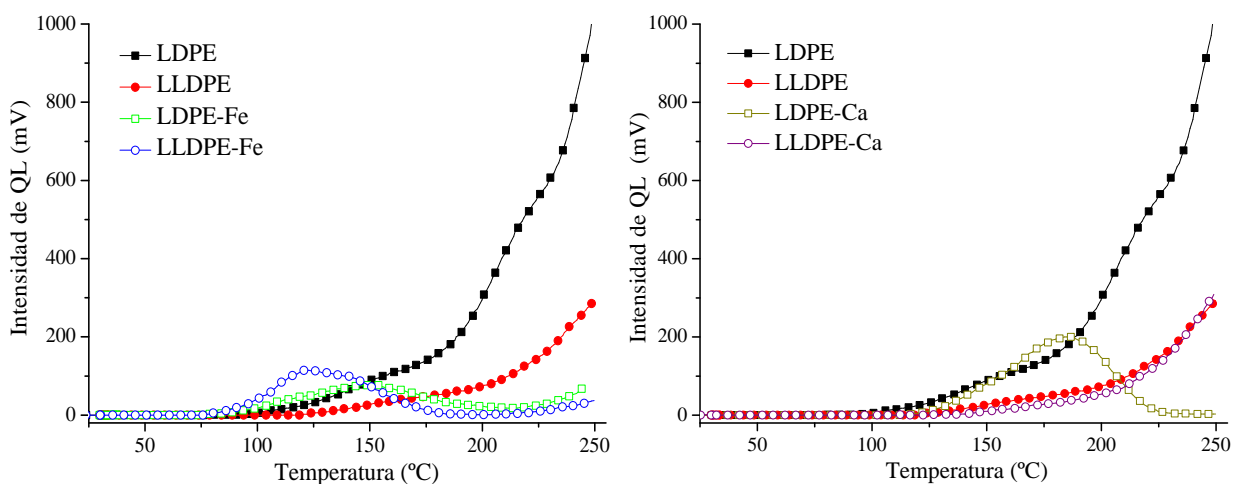


Figura IV.4: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para los materiales iniciales tras 9 semanas de exposición a la intemperie.

Mediante análisis de FTIR se ha determinado el contenido de especies carbonilo a distintos tiempos de exposición generados a partir de la formación de hidroperóxidos y su posterior descomposición, de acuerdo al mecanismo de oxidación de las poliolefinas.

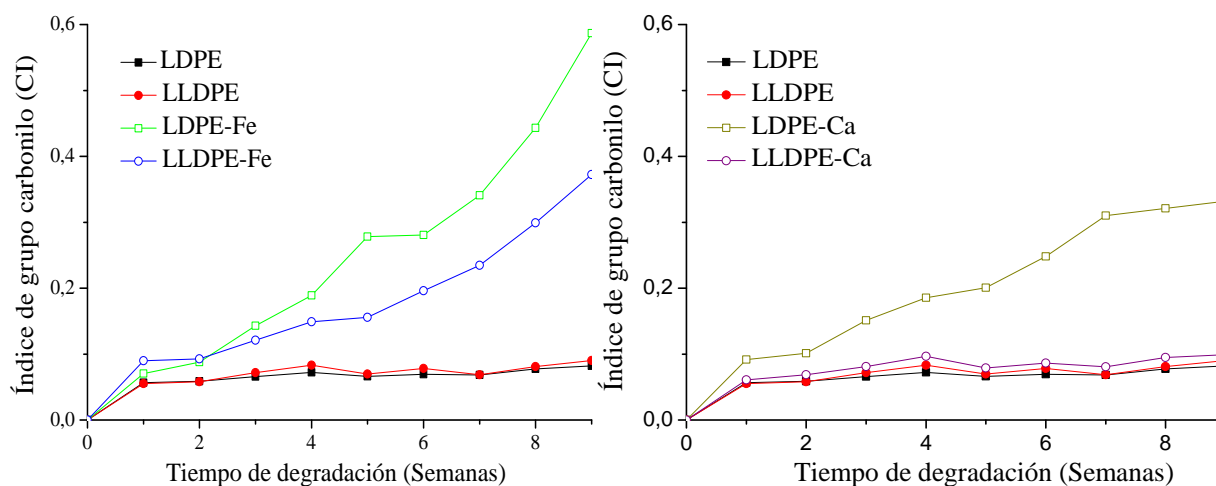


Figura IV.5: Variación de valores de índice de grupo carbonilo con el tiempo de exposición a la intemperie.

Los materiales LDPE y LLDPE muestran los valores de índice de carbonilo más bajas a diferentes tiempos de exposición, asociado con el bajo nivel de oxidación y que está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante análisis de quimioluminiscencia. Los materiales que contienen aditivos pro-oxidantes, presentan mayores valores de CI que aumentan gradualmente desde el comienzo de la oxidación, observando una mayor actividad del estearato de Fe respecto al de Ca (**Figura IV.5**).

Desde un punto de vista práctico, el análisis de los procesos de oxidación de polímeros se lleva a cabo mediante ensayos de laboratorio acelerados, en los que se reduce el tiempo de análisis de manera considerable. En este trabajo, los filmes de polietileno con ambos estearatos, han sido sometidos a foto-envejecimiento acelerado por un período de 500 h, y caracterizados a distintos tiempos de degradación mediante análisis isoterma de emisión de QL en atmósfera de nitrógeno y FTIR (**Figura IV.6**). Se ha observado que la intensidad de QL, determinada como el valor máximo en el pico de emisión, y el índice de carbonilo aumentan hasta 200 h de tiempo de envejecimiento, a partir del cual se produce un descenso gradual de la emisión de QL acompañado de un aumento en la formación de especies carbonilo, indicando que la descomposición de hidroperóxidos prevalece sobre su formación. En el caso de LLDPE-Ca, la emisión de QL e índice de carbonilo aumentan hasta 500 h de fotodegradación.

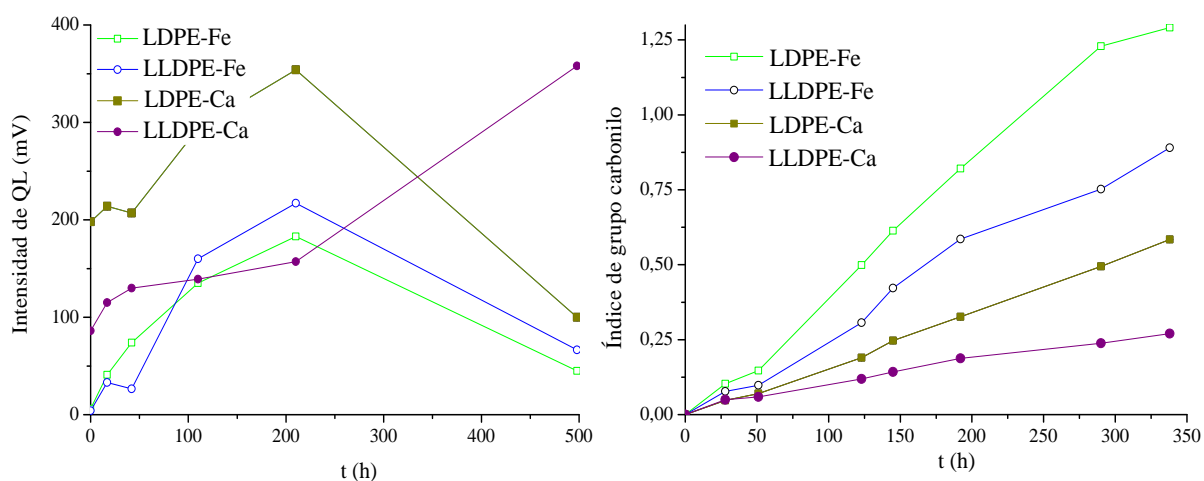


Figura IV.6: Valores de intensidad máxima de emisión de quimioluminiscencia en el análisis isoterma a 170°C y en atmósfera de nitrógeno (Izq.) y de índice de grupo carbonilo (Dcha.).

El análisis dinámico de QL en atmósfera de nitrógeno de las muestras degradadas de forma acelerada presenta un comportamiento similar al de las muestras degradadas a la intemperie, observando un aumento de la intensidad y desplazamiento a menores temperaturas de la emisión respecto a las muestras iniciales (**Figura IV.7**). Como ejemplo, en la figura se muestra la evolución de la curva de QL a diferentes tiempos de degradación para LDPE-Ca, que refleja la formación de hidroperóxidos de distinta estabilidad.

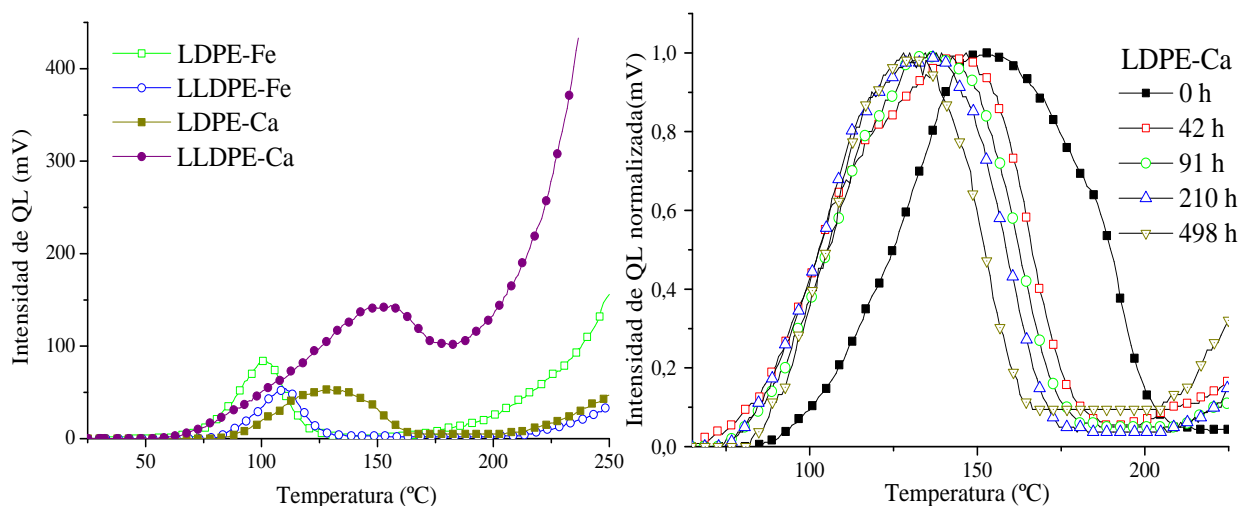


Figura IV.7: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para muestras fotodegradadas de forma acelerada.

Mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, se han analizado los productos de bajo peso molecular extraídos de las muestras iniciales y degradadas (Contat-Rodrigo, L. y cols. 2001; Khabbaz, F. y cols. 1998) lo que permite identificar las especies formadas durante el proceso de envejecimiento acelerado (**Figura IV.8**). Los productos de degradación fueron identificados comparando su espectro de masas con los espectros de la base de datos NTS. El contenido de productos obtenidos a partir de las muestras iniciales es muy bajo e incrementa con el tiempo de exposición UV, alcanzando valores mayores para polietilenos con estearato de Fe. En todos los casos, los productos identificados son hidrocarburos de bajo peso molecular de menos de 30 carbonos, y su concentración aumenta con el peso molecular.

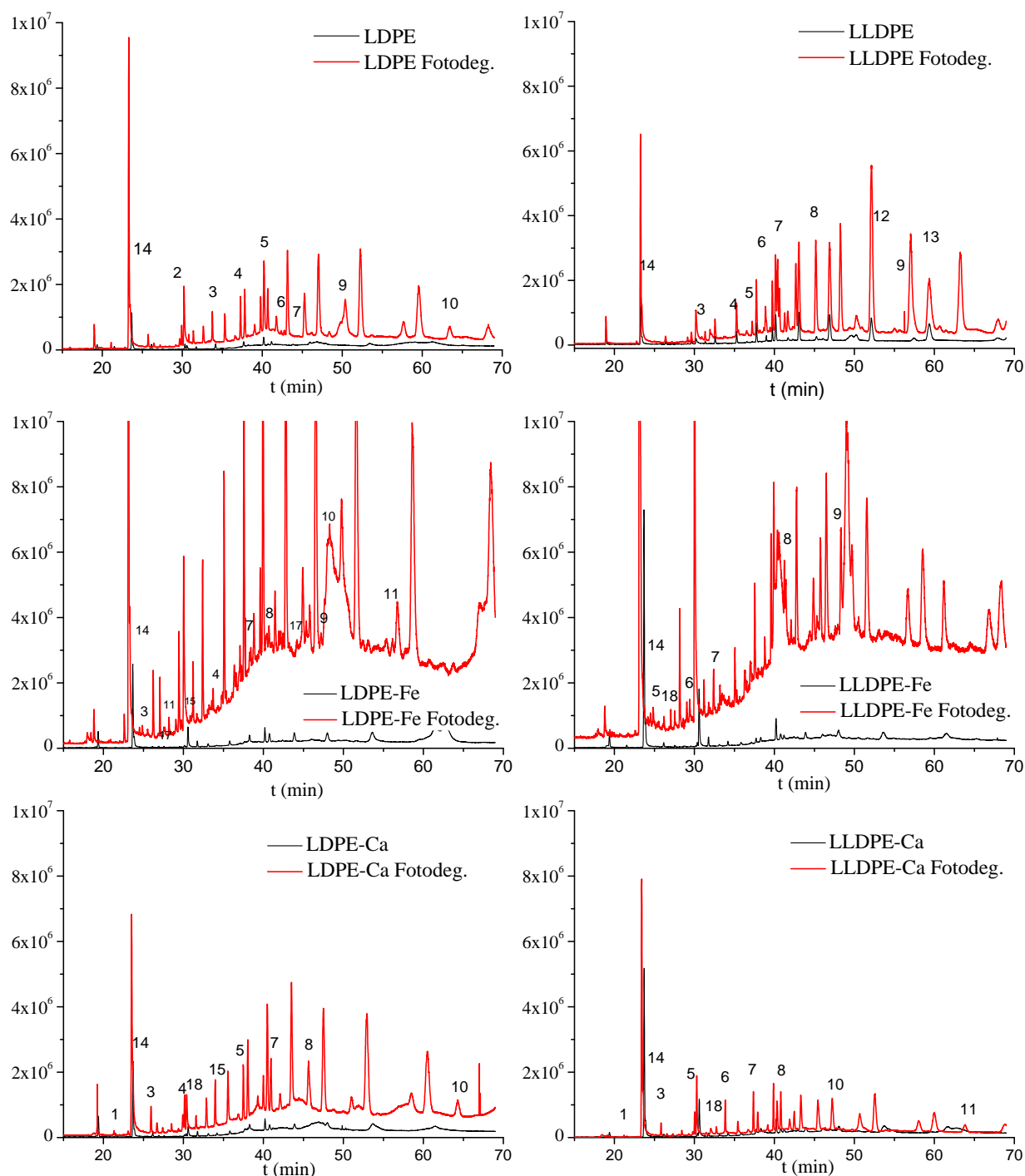


Figura IV.8: Cromatogramas GC-MS de los productos extraídos de las muestras iniciales y fotodegradadas. (1) Hexadecano, (2) Heptadecano, (3) Octadecano, (4) Tetracosano, (5) Hexacosano, (6) Heptacosano, (7) Eicosano, (8) Docosano, (9) Octacosano, (10) Nonacosano, (11) Tricontano, (12) Hexatricontano, (13) Dotriacontano, (14) Tetradecanol, (15) Hexadecanol, (16) 1-Pentadeceno, (17) 1-Hexacoseno, (18) 1-Octadeceno.

Se han analizado los cambios producidos en la distribución de pesos moleculares para las distintas muestras fotodegradadas. El peso molecular promedio en peso (M_w), el peso molecular promedio en número (M_n) y la polidispersidad (PD) (**Tabla IV.4**) muestran una disminución mucho mayor en las muestras LDPE-Fe y LDPE-Ca que en el caso de LDPE.

Tabla IV.4: Datos de GPC obtenidos para materiales iniciales y fotodegradados.

Análisis de GPC	Inicial			Fotodegradado		
	M_n	M_w	PD	M_n	M_w	PD
LDPE	17230	73150	4.3	8510	37890	4.4
LDPE-Fe	14370	99620	6.9	2210	5310	2.4
LDPE-Ca	14970	94290	6.3	3110	8090	2.6
LLDPE	38400	94300	2.4	16500	49830	3.0
LLDPE-Fe	31550	83340	2.6	3060	14290	4.7
LLDPE-Ca	30920	84370	2.7	8950	25840	2.9

Basándonos en los resultados obtenidos para los filmes con estearatos de Fe y Ca, en los que se ha observado como el mayor grado de ramificación del polietileno de baja densidad (LDPE) favorece la degradación abiótica de los materiales, se ha llevado a cabo el estudio del comportamiento de filmes de LDPE con estearatos de Co y Mn (LDPE-Co, LDPE-Mn) frente a la degradación, debido a la marcada capacidad de estos metales de transición en la descomposición de hidroperóxidos (Roy, P.K. y cols. 2006b). La comparación con los resultados obtenidos para LDPE-Fe y LDPE-Ca, permite determinar la actividad de estos aditivos pro-oxidantes.

Las muestras han sido sometidas a exposición UV acelerada, y se ha observado que tras un período de 240 horas los filmes LDPE-Co y LDPE-Mn se deterioran visiblemente tomando ese valor como tiempo límite de exposición. El desplazamiento del onset de emisión de QL y el aumento del pico de emisión en las medidas dinámicas en atmósfera de nitrógeno confirman una eficiente formación de hidroperóxidos en los materiales con estearatos de Co y Mn durante la oxidación fotoquímica en el intervalo de tiempo de exposición utilizado en este caso, frente al material puro y con estearato de Fe y Ca (**Figura IV.9**) (**Anexo 1- Tabla 1**).

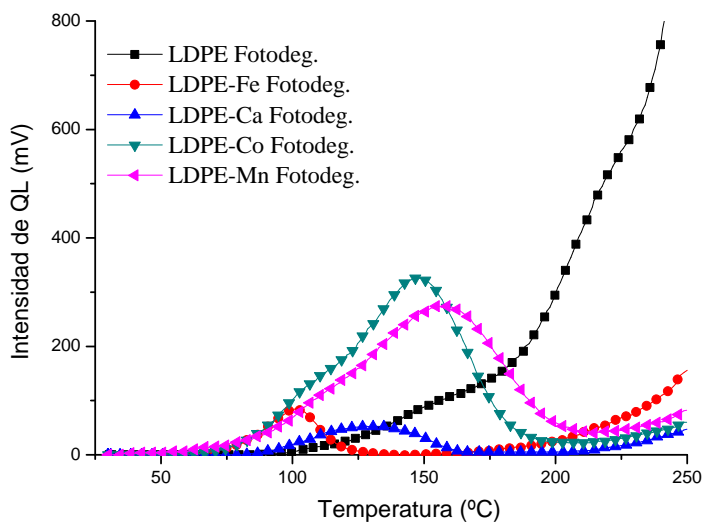


Figura IV.9: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para muestras de LDPE fotodegradadas.

Para las muestras LDPE-Co, LDPE-Mn fotodegradadas durante un período de 240 h, los valores alcanzados de índice de grupo carbonilo son similares a los determinados en polietileno con estearato de Fe y Ca (**Figura IV.10**). En el espectro infrarrojo de las muestras se observa la aparición de una banda a 1710 cm^{-1} correspondiente a la formación de grupos carbonilo cetónicos, así como, un pequeño hombro en torno a 1733 cm^{-1} correspondiente a la formación de grupos carbonilo de éster y/o aldehído.

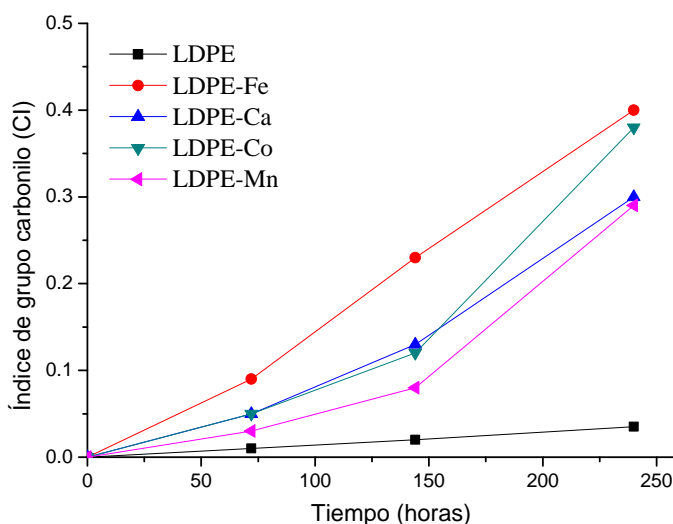


Figura IV.10: Valores de índice de grupo carbonilo para las muestras fotodegradadas de forma acelerada durante 240 horas.

La estabilidad térmica de las muestras iniciales y fotodegradadas se estudió mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) (**Anexo 1-Tabla 2**) y análisis termogravimétrico (TGA) en atmósfera de nitrógeno. Se obtuvieron curvas con una sola etapa de degradación, a partir de las que se han determinado T_{10} y T_{max} . En presencia de estearatos los materiales presentan pérdida de peso a temperaturas inferiores a LDPE, siendo este efecto más acusado para los materiales fotodegradados LDPE-Co y LDPE-Mn, que confirma su actividad pro-oxidante. (**Tabla IV.5**).

Tabla IV.5: Temperatura de pérdidas de peso 10 % y 50 % obtenidas mediante TGA.

Análisis de TGA	T_{10} (°C)		T_{max} (°C)	
	Inicial	Fotodeg	Inicial	Fotodeg
LDPE	456	437	490	480
LDPE-Fe	431	381	480	480
LDPE-Ca	417	368	486	482
LDPE-Co	440	370	475	466
LDPE-Mn	432	379	483	473

Se ha analizado la distribución de pesos moleculares para las distintas muestras iniciales y fotodegradadas. Se han determinado para LDPE-Co valores más bajos de peso molecular promedio en peso (M_w), peso molecular promedio en número (M_n) y polidispersidad (PD), que refleja una mayor eficiencia en la degradación durante el procesado, que conduce a ruptura de cadena en el polímero. En general, se observa una disminución para los materiales fotodegradados, siendo esta variación mayor en LDPE-Co y LDPE-Mn que para los polietilenos con estearato de Fe y Ca. (**Tabla IV.6**).

Tabla IV.6: Valores de pesos moleculares (M_n , M_w) y polidispersidad (PD) obtenidos mediante GPC.

Análisis de GPC	Inicial			Fotodegradado		
	M_n	M_w	PD	M_n	M_w	PD
LDPE-Fe	14370	99620	6.9	2210	5310	2.4
LDPE-Ca	14970	94290	6.3	3110	8090	2.6
LDPE-Co	4714	15076	3,2	1469	4527	3,1
LDPE-Mn	13007	67913	5,2	1250	3283	2,6

Se ha llevado a cabo el estudio superficial de los materiales iniciales y fotodegradados, mediante medidas de ángulo de contacto, empleando agua como fase líquida. Para todos los casos se ha observado una disminución de los valores obtenidos en los materiales tras la exposición UV (**Tabla IV.7**) como consecuencia de un aumento del carácter hidrofílico en la superficie, siendo mayor esta disminución para los materiales con estearato de Co y Mn como aditivos.

Tabla IV.7: Medidas de ángulo de contacto en filmes de polietileno.

Medidas de Ángulo de contacto	Inicial	Fotodegradado
LDPE	$99,1 \pm 0,7$	$90,8 \pm 1,2$
LDPE-Fe	$97,3 \pm 1,9$	$89,9 \pm 4,1$
LDPE-Ca	$97,7 \pm 2,1$	$89,9 \pm 2,6$
LDPE-Co	$97,2 \pm 0,9$	$89,5 \pm 0,8$
LDPE-Mn	$99,8 \pm 1,2$	$82,9 \pm 1,5$

IV.2.2. Degradación termo-oxidativa de filmes de polietileno con estearatos de Ca, Fe, Co y Mn.

Las poliolefinas oxo-biodegradables son materiales biodegradables que deben cumplir con el requisito de un alto nivel de mineralización en un periodo de tiempo razonable. En estos materiales es fundamental acelerar su degradación, siendo la incorporación de aditivos pro-oxidantes eficientes una vía de mucho interés. El que estos aditivos pro-degradantes actúen como termo-oxidantes, además de foto-oxidantes, es de interés por el aprovechamiento combinado de la luz y calor. Por ello, se ha estudiado de forma comparativa la capacidad termo-degradante de los estearatos de Ca, Fe, Co y Mn en este Trabajo, aunque ya existen precedentes no comparativos de estudio de la degradación térmica que inducen Co y Mn en polietileno (Kkabbaz, F. y cols. 1999 y 2001; Roy, P.K. y cols. 2007a).

La actividad de los pro-oxidantes de Fe y Ca en la oxidación térmica de los polietilenos LDPE y LLDPE ha sido estudiada mediante el análisis isoterma de emisión de quimioluminiscencia en atmósfera de oxígeno (**Figura IV.11**). La intensidad de emisión de QL en oxígeno aumenta drásticamente respecto a la obtenida en nitrógeno, debido a

que las muestras son oxidadas en una reacción controlada por difusión simultánea a la emisión. En todos los casos se observan dos máximos de emisión, un primer pico de menor intensidad que aparece como un hombro de la curva, y un segundo máximo cuya intensidad y tiempo es dependiente de la estructura y la presencia de estearatos. En general, se observa un aumento de la intensidad de QL y disminución de los tiempos de inducción a la oxidación (OIT) al incorporar pro-oxidantes en ambos polietilenos y en particular para los materiales con mayor número de ramificaciones (LDPE).

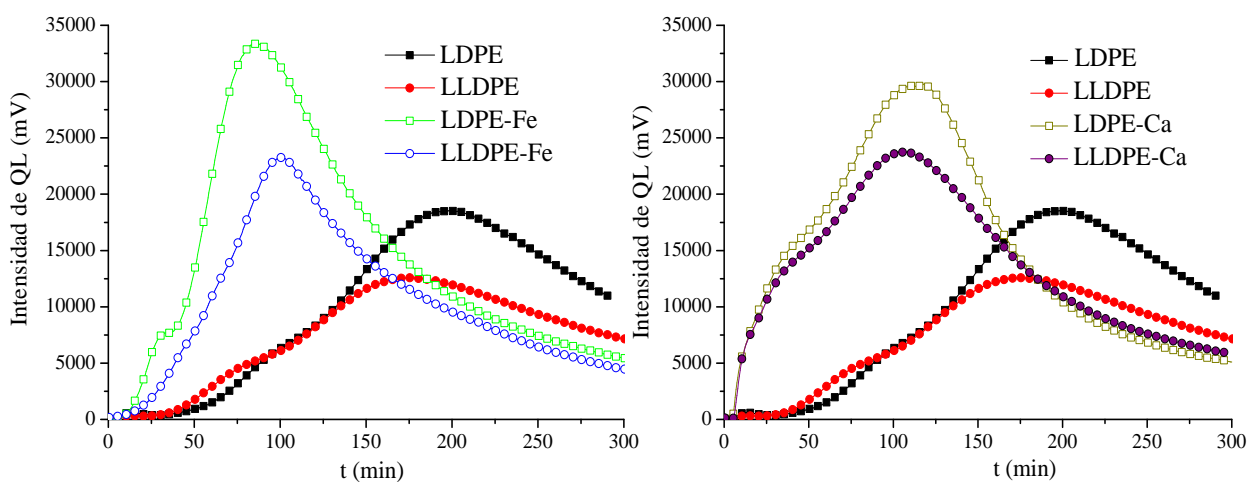


Figura IV.11: Curvas de emisión de quimioluminiscencia a 170 °C en atmósfera de oxígeno.

Con el fin de comparar la actividad pro-oxidante de los estearatos de Co y Mn en el polietileno de baja densidad se ha realizado de la misma forma el análisis isoterma de QL de las muestras en atmósfera de oxígeno. Los resultados obtenidos muestran una mayor actividad termo-oxidativa de los estearatos de Co y Mn, como refleja el aumento de la intensidad de emisión y menores valores de tiempo de inducción a la oxidación (OIT) en LDPE-Co y LDPE-Mn, respecto a LDPE-Fe y LDPE-Ca (**Figura IV.12**). Las curvas de quimioluminiscencia siguen los mismos perfiles comentados anteriormente, con dos picos de emisión dependientes de la presencia de aditivo pro-oxidante.

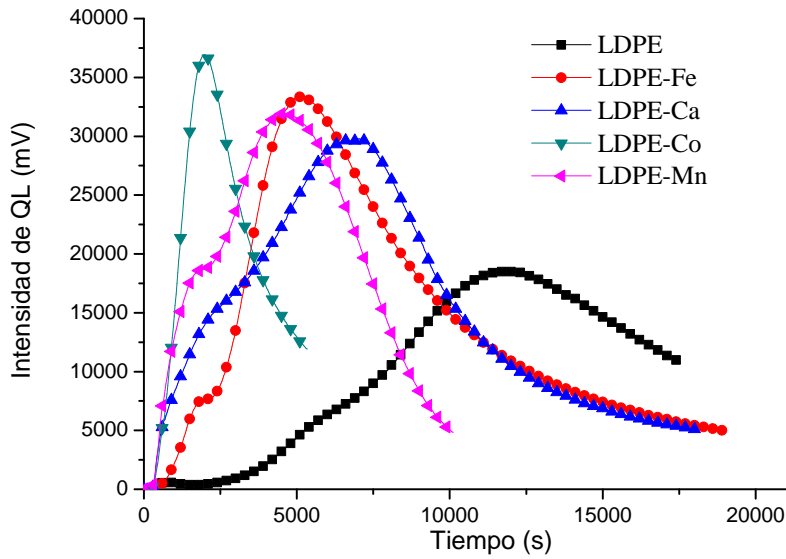


Figura IV.12: Curvas de emisión de quimioluminiscencia a 170°C en atmósfera de oxígeno.

Se han estudiado las cinéticas de degradación térmica en los diferentes materiales, en ausencia (LDPE) y presencia de aditivos pro-oxidantes (LDPE-Co, LDPE-Mn, y LDPE-Fe), mediante análisis termogravimétrico en atmósfera de nitrógeno. Existen en la literatura diversos métodos desarrollados que permiten el cálculo de las energías de activación (Aboulkas, A. y cols. 2010; Jakubowicz, I., 2003; Jakubowicz, I. y cols. 2011; Roy, P.K. y cols. 2007a y b; Baloch, M.K. y cols. 2011), siendo aquellos basados en varias curvas (a distintas velocidades de calentamiento) considerados más exactos que los basados en una sola curva.

La energía de activación ha sido calculada mediante la ecuación descrita por Park (Park. J.W. y cols. 2000) [IV-1], que ha sido utilizada anteriormente para el estudio de la influencia del grado de ramificación en las cinéticas de descomposición de polietilenos (Corrales, T. y cols. 2002):

$$\ln \beta = \ln A_0 + \frac{3}{2} \ln T_{max} - \ln \left(\frac{E_a}{RT_{max}} + \frac{1}{2} \right) - \frac{E_a}{RT_{max}} \quad \text{[IV-1]}$$

donde β es la velocidad de calentamiento (3, 5, 7 y 10 K/min), R la constante de los gases ($R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) y T_{max} la temperatura máxima (K). Las energías de activación se calculan a partir de la pendiente en la representación de $\ln \beta$ frente a los valores de $1/T_{\text{max}}$ (**Figura IV.13**).

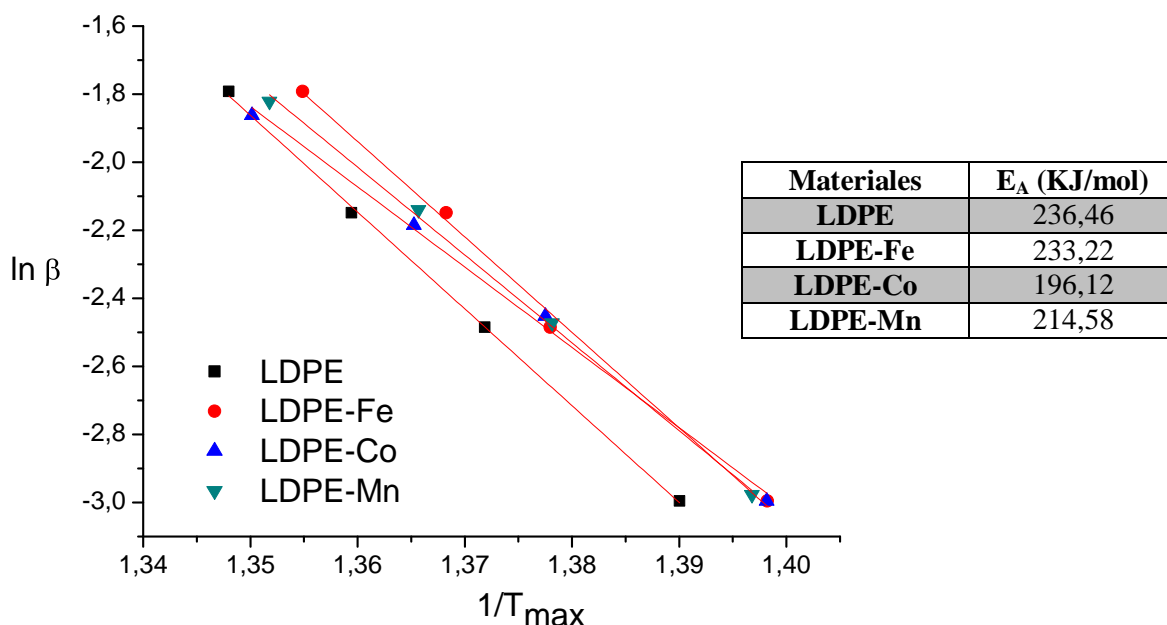


Figura IV.13: Representación de $\ln \beta$ vs $1/T_{\text{max}}$.

Los valores de energías de activación más bajos obtenidos para LDPE-Co y LDPE-Mn confirman la mayor actividad de los estearatos de Co y Mn como aditivos en la degradación térmica de polietileno.

Se ha estudiado el comportamiento de los filmes de LDPE con estearatos de Fe, Co y Mn en un intervalo de temperaturas entre 45 °C y 90 °C, temperaturas que están dentro del rango de las alcanzadas en la aplicación de compostaje. Tras una exposición de 75 horas (tiempo en el que se alcanza una degradación extrema de los filmes) a una temperatura constante de 90°C se observa un gran deterioro de los materiales con aditivos termo-oxidantes (LDPE-Co y LDPE-Mn) en comparación con los materiales LDPE y LDPE-Fe.

La mayoría de los productos de oxidación en la degradación termo-oxidativa de polietileno se compone de grupos carbonilo. De la misma forma que se ha observado en la degradación fotoquímica, la absorción correspondiente a estos grupos carbonilo se

compone de diferentes bandas: ácido (1700 cm^{-1}), cetona (1714 cm^{-1}), aldehído/éster (1733 cm^{-1}) y lactona (1780 cm^{-1}) (Gulmine, J.V. y cols. 2003; Khabbaz, F. y cols. 1999). En los polietilenos según avanza la termo-oxidación, se observa la aparición de una banda a 1710 cm^{-1} correspondiente a la formación de grupos carbonilo cetónicos así como un pequeño hombro en torno a 1733 cm^{-1} correspondiente a la formación de grupos carbonilo de éster y/o aldehído junto a una leve formación de la banda correspondiente a la formación de lactonas en 1780 cm^{-1} a temperatura elevadas. El aumento de estas bandas características fue muy pronunciado en comparación con los filmes sin aditivos termo-oxidantes, donde no se observaron cambios en el material en las condiciones extremas utilizadas (90°C) (**Figura IV.14**).

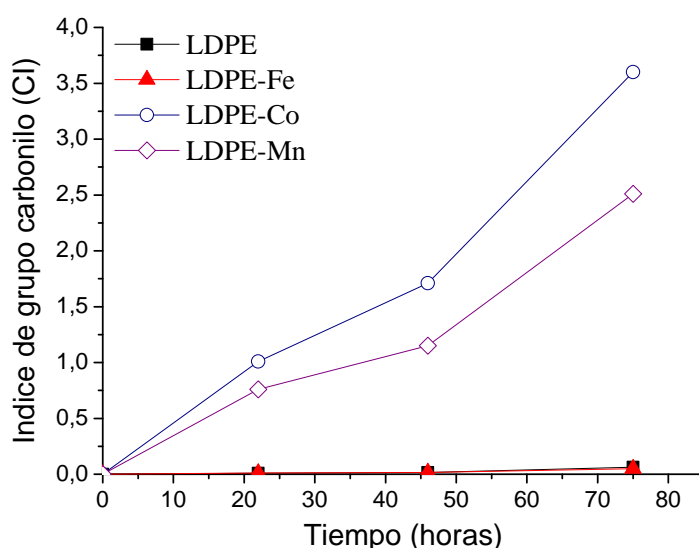


Figura IV.14: Análisis de FTIR de filmes de LDPE tras 75 horas de exposición a 90°C . (Banda de grupo carbonilo en 1710 cm^{-1}).

En el resto de experimentos de termo-degradación se han sometido los filmes a un tratamiento térmico a diferentes temperaturas 70°C , 60°C , 55°C y 45°C durante 216 horas (9 días), periodo de tiempo al cual los filmes a 70°C ya muestran signos externos de degradación. En general se observa un aumento del índice de grupo carbonilo de manera eficiente en el intervalo de temperaturas de 70°C a 55°C , (**Figura IV.15**). En el envejecimiento térmico a 45°C , después de 9 días no se aprecia ninguna formación de especies carbonílicas aunque si un comienzo de su degradación en términos de formación de hidropéroxidos mediante emisión de QL, como se describe más adelante.

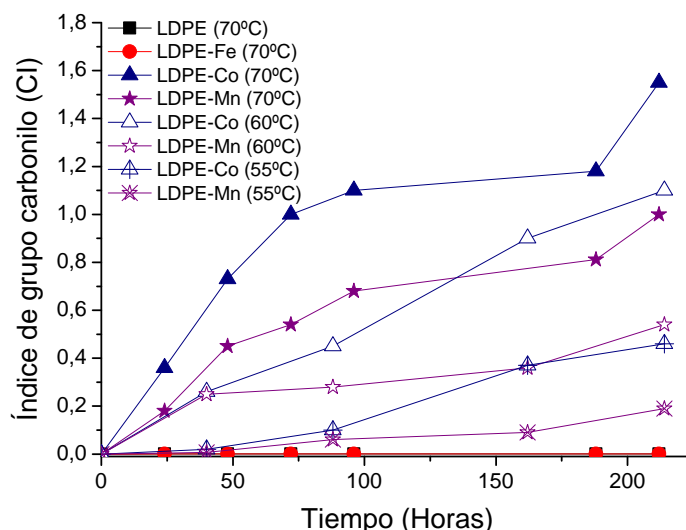


Figura IV.15: Análisis de FTIR de filmes de LDPE tras 9 días de exposición a diferentes temperaturas.

Mediante un análisis isoterma de emisión de quimioluminiscencia (**Tabla IV.8**), se ha observado cómo, al disminuir la temperatura, se produce un aumento de la intensidad de emisión de QL debido a que la velocidad de formación de hidroperóxidos es mayor que su descomposición. A 45°C, a pesar de no observar formación de especies carbonílicas si se aprecia la aparición de especies de oxidación de tipo hidroperóxido, lo que muestra una eficiente oxidación incluso a bajas temperaturas en presencia de los estearatos de Co y Mn.

Tabla IV.8: Valores de intensidad máxima de quimioluminiscencia (Isoterma, 170°C y atmósfera de nitrógeno) para las diferentes temperaturas utilizadas durante 9 días.

Análisis de QL	$I_{\max QL}$ (mV)					
	Inicial	90°C*	70°C	60°C	55°C	45°C
LDPE	7	44	24	35	16	15
LDPE-Fe	1	3	17	34	25	30
LDPE-Co	30	243	118	250	350	460
LDPE-Mn	22	263	167	204	289	315

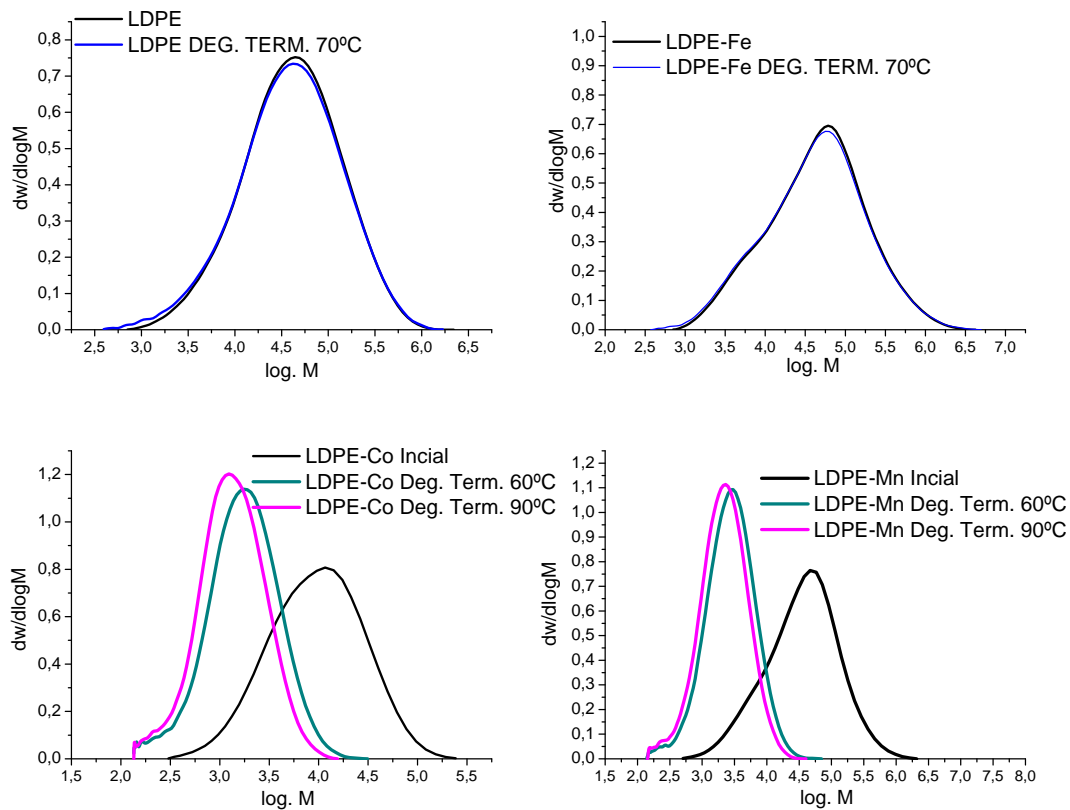
* a 90 °C el tratamiento térmico fue de 75 horas.

Para las muestras termo-degradadas no se ha observado una gran variación en el grado de cristalinidad (**Anexo 1-Tabla 3**). El análisis mediante TGA evidencia una clara desestabilización de los materiales con aditivos termo-oxidantes después de la

degradación, en los que el onset de pérdida de peso disminuye de forma drástica (T_{10}). (Tabla IV.9). Este resultado es confirmado mediante análisis por GPC, que muestra la disminución de los pesos moleculares para LDPE-Co y LDPE-Mn tratados térmicamente (Figura IV.16).

Tabla IV.9: Datos de TGA de materiales iniciales y degradados térmicamente.

Análisis de TGA	T_{10} (°C)					
	Inicial	90°C	70°C	60°C	55°C	45°C
LDPE	456	425	429	433	429	430
LDPE-Fe	431	428	430	423	424	426
LDPE-Co	440	258	260	262	354	400
LDPE-Mn	432	295	296	342	403	427



Análisis de GPC	Inicial			Deg. Term. 60°C			Deg. Term. 90°C		
	M_n	M_w	PD	M_n	M_w	PD	M_n	M_w	PD
LDPE-Co	4714	15076	3,19	883	2071	2,34	757	1537	2,03
LDPE-Mn	13007	67913	5,22	1429	3470	2,42	1171	2678	2,28

Figura IV.16: Distribuciones y pesos moleculares promedio obtenidos por GPC para los filmes degradados térmicamente.

IV.2.3. Degradación fotoquímica de copolímeros etileno-acetato de vinilo (EVA) con estearatos de Fe y Ca.

Se han utilizado filmes de EVA con un contenido en acetato de vinilo del 9% y espesor de 25 micras, adecuados para la aplicación de acolchado. Se ha estudiado el efecto de la incorporación de los estearatos de Fe y Ca como aditivos pro-oxidantes en el envejecimiento fotoquímico acelerado tras 432 horas de exposición. Analizando los espectros de FTIR obtenidos se observan cambios notables en las bandas características correspondientes a grupos funcionales que aparecen tras el envejecimiento acelerado (**Figura I.6**) (Chen, S. y cols. 2009; Allen, N.S. y cols. 2000; Rodriguez-Vazquez, M. y cols. 2006).

El análisis de la evolución del índice de grupo carbonilo con la fotodegradación muestra la variación de dos bandas de absorción características a 1715 cm^{-1} y 1175 cm^{-1} , asignadas a grupos carbonilo cetónicos (**Figura IV.17**). Así mismo, se observa la disminución de las bandas de absorción de ester (acetato) a 1735 cm^{-1} y de vibración a 1238 cm^{-1} asignada a la banda de tensión asimétrica $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ (Haken, J.K. y cols. 1971), y la formación de una nueva banda a 1780 cm^{-1} asignada a la formación de lactonas (Haslam, J. y cols. 1972) (**Anexo 1-Tabla 4**).

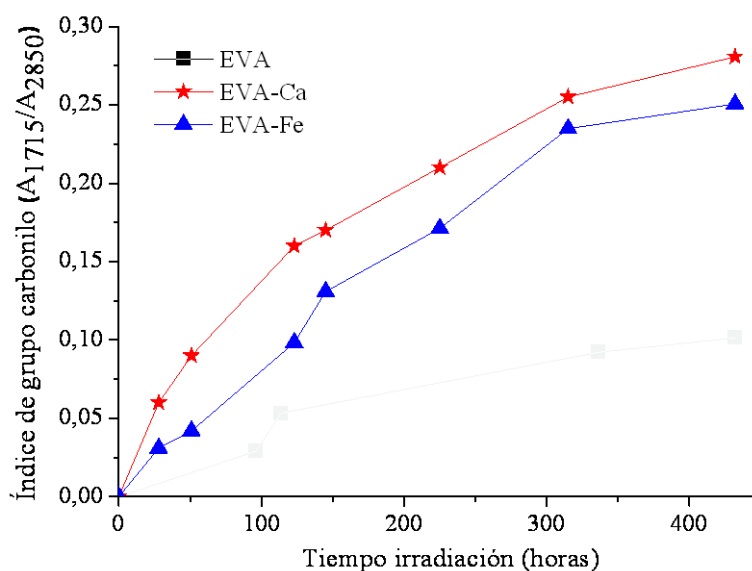


Figura IV.17: Evolución del índice de grupo carbonilo con el tiempo de exposición.

De manera similar a los resultados obtenidos para la degradación de polietileno, los estearatos de Fe y Ca aumentan notablemente la formación de grupos cetónicos respecto al EVA puro.

En el análisis dinámico de emisión de quimioluminiscencia en nitrógeno para las muestras iniciales, se observa el desplazamiento de los onset de emisión a menores temperaturas en presencia de aditivos pro-oxidantes EVA-Ca y EVA-Fe, ($T_{CLonset} = 160$ °C y 175 °C respectivamente) respecto al EVA ($T_{CLonset} = 190$ °C), lo que indica un mayor contenido en hidroperóxidos y una mayor oxidación del material con estearatos durante su procesado (**Figura IV.18**).

Para las muestras fotodegradadas, la intensidad de emisión de QL aumenta y se desplaza a menores temperaturas respecto a las muestras iniciales, siendo este efecto más acusado para EVA-Ca y EVA-Fe debido a la degradación durante la exposición UV, y que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por FTIR.

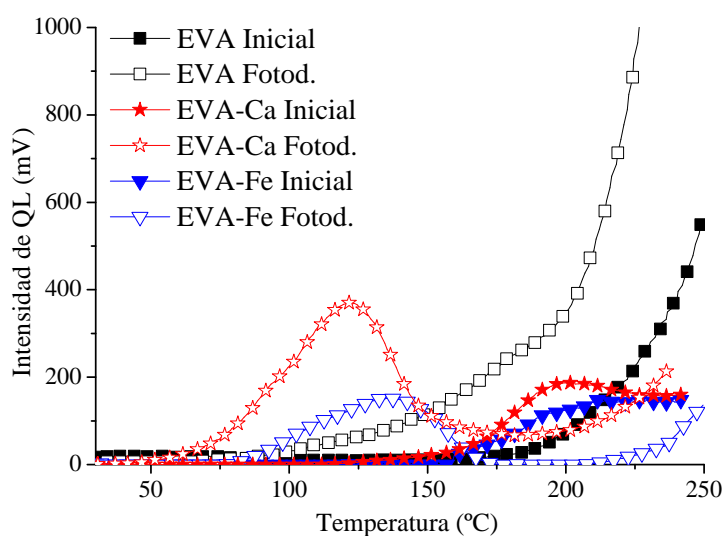


Figura IV.18: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para muestras de EVA iniciales y fotodegradadas.

El mayor grado de degradación alcanzado en las muestras con estearatos se confirma en los análisis de emisión de QL en atmósfera de oxígeno, (**Figura IV.19**). El máximo de emisión está desplazado a menores tiempos de oxidación, y se obtienen menores intensidades de emisión respecto a EVA, asociado a la descomposición de

hidroperóxidos catalizada por los complejos de iones metálicos que permiten la generación de radicales, los cuales inician la oxidación de las cadenas de polietileno del EVA (Jirackova-Audouin, L. y cols. 1987).

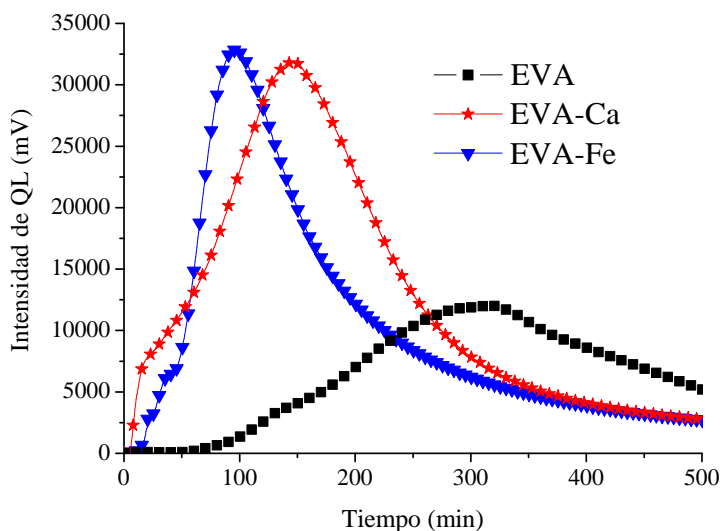


Figura IV.19: Análisis de emisión de quimioluminiscencia de filmes de EVA iniciales, a 170 °C en atmósfera de oxígeno.

Las muestras iniciales y fotodegradadas han sido analizadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC), y muestran una endoterma de fusión que comienza a una temperatura por debajo de 60°C (Brogly, M. y cols. 1997) (**Anexo 1-Figura 1**). La temperatura a la cual aparece este pico permanece constante tanto en los materiales iniciales como en los fotodegradados, y se observa un ligero aumento de la cristalinidad para los materiales después del envejecimiento (Jin, J. y cols. 2010b; Liu, M. y cols. 1995), lo que indica una estabilidad de las regiones cristalinas en el EVA y la fotodegradación de las zonas amorfas del material. La menor estabilidad de los filmes con pro-oxidantes se refleja en los tiempos de inducción a la oxidación (OIT) determinados. (**Tabla IV.10**).

Tabla IV.10: Valores de temperatura de fusión (T_m), cristalinidad (χ_c) y tiempo de inducción a la oxidación (OIT) obtenidos mediante DSC. Temperatura de pérdidas de peso 5 %, 10 % y 50 % (T_5 , T_{10} y T_{50}) obtenidas mediante TGA.

Análisis de DSC y TGA	DSC			TGA				DTGA	
	T_m (°C)	χ_c (%)	OIT (s)	T_5 (°C)	T_{10} (°C)	T_{50} (°C)	ΔW_1 (%)	T_{st1} (°C)	T_{st2} (°C)
EVA	105	24	170	349	415	460	8.4	359	469
EVA Fotodeg.	105	25	-	293	362	450	16.1	358	460
EVA-Ca	103	23	116	349	420	473	9.2	371	479
EVA-Ca Fotodeg.	103	28	-	276	356	466	19.7	372	480
EVA-Fe	101	23	117	357	395	478	8.6	371	484
EVA-Fe Fotodeg.	103	27.9	-	285	368	472	18.2	369	482

En los termogramas obtenidos mediante análisis termogravimétrico (TGA) se observan dos pérdidas de peso (**Anexo I, Figura 2**); la primera, por debajo de 400°C, debida a la desacetilación de la fracción de acetato presente en el EVA (Reacción Norrish II) y la segunda en el intervalo de 400-520°C donde se produce la ruptura completa de las cadenas del material (**Tabla IV.10**) (Zhao, W. y cols. 1994; Jin, J. y cols. 2010a). Los materiales iniciales muestran una primera pérdida de peso menor, aproximadamente 9 %, respecto a los materiales degradados que alcanzan valores de 19.7 y 18.2 % en EVA-Ca y EVA-Fe respectivamente, en los que además se observa un desplazamiento a menores temperaturas de T_{10} y T_{50} .

Como se ha descrito anteriormente para el polietileno, la fotodegradación de los materiales provoca una disminución de los pesos moleculares analizados por GPC (**Tabla IV.11**).

Tabla IV.11: Datos de GPC de peso molecular promedio en número (M_n), de peso molecular promedio en peso (M_w), pico de peso molecular (M_p) y polidispersidad (PD) de los materiales iniciales y fotodegradados 432 horas.

Análisis de GPC	Inicial				Fotodegradado			
	M_n	M_w	M_p	PD	M_n	M_w	M_p	PD
EVA	11060	87700	28300	7.9	3430	29100	5870	8.5
EVA-Ca	8530	33900	18822	4.0	2800	6680	3710	2.8
EVA-Fe	13600	119500	38900	8.8	2280	14240	3840	6.2

IV.3. Biodegradación de polietilenos por bacterias.

En esta parte del Trabajo, se ha comparado la biodegradación de poliolefinas, polietilenos y copolímero EVA, altamente fotodegradadas (Abrusci, C. y cols. 2011 y 2012; Pablos, J.L. y cols. 2010) conteniendo estearatos de Ca y de Fe como aditivos pro-oxidantes, así como de Co y Mn como aditivos termo-oxidantes mediante diferentes técnicas que han demostrado su sensibilidad para el estudio de biodegradación de polímeros (Abrusci, C. y cols. 2004a; Abrusci, C. y cols. 2007a y b).

A continuación vamos a detallar los resultados obtenidos en los diferentes estudios, formación de biofilme y de biodegradación, que han sido llevados a cabo empleando diferentes técnicas para valorar la biodegradación de los filmes agrícolas.

IV.3.1. Formación de biofilme.

Uno de los aspectos más importantes durante la biodegradación de un material, es el crecimiento continuado de los microorganismos durante todo el proceso (Hadad, D. y cols. 2005). El crecimiento inicial de los microorganismos puede ser estudiado mediante un análisis de la formación de biofilme (Nostro, A. y cols. 2010) en la superficie del polímero (Hori, K. y cols. 2010; Chiellini, E. y cols. 2003; Reddy, M.M. y cols. 2009;

Bonhomme, S. y cols. 2003). La formación de biofilme en la superficie de los materiales estudiados se caracterizó mediante un análisis de ángulo de contacto, SEM y FTIR.

Las muestras fueron recogidas de los reactores de ensayo descritos anteriormente en el Capítulo de Materiales y Métodos (**Apartado III.5**) después de una semana de exposición a los microorganismos, se procedió al estudio de la formación de biofilme. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) indican de manera clara que en todos los materiales estudiados, las bacterias únicamente colonizan la superficie de los materiales degradados abióticamente (foto-oxidados) en contraste con los materiales sin degradar en los que no se observa la formación de biofilm. A continuación se muestran las imágenes correspondientes al material fotodegradado LLDPE-Ca utilizando MIX y *Brevibacillus borstelensis* (**Figura IV.20**).

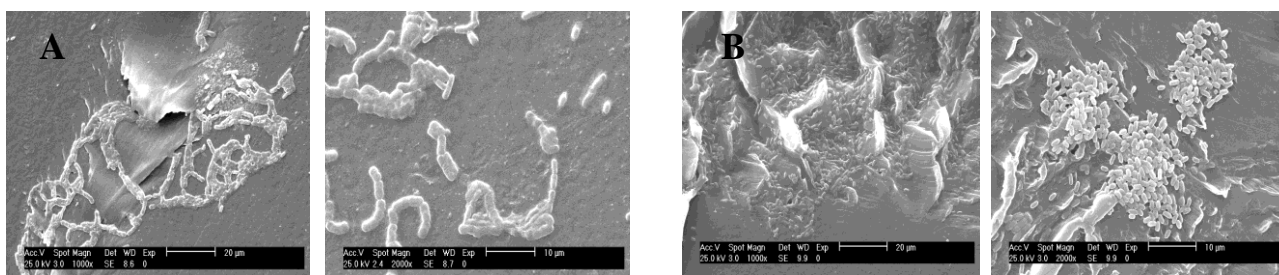


Figura IV.20: Biofilmes observados en filmes fotodegradados de LLDPE-Ca: A) con la mezcla de *Bacillus* MIX y B) con *B. borstelensis* (Izq. 1000x, Dcha 2000x).

La existencia de la formación de biofilm en los polietilenos fotodegradados fue confirmada mediante el registro de los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier empleando el accesorio de reflexión total atenuada ATR-FTIR (**Figura IV.21**). En los espectros de las muestras degradadas se observa la aparición de nuevas bandas cuya intensidad depende de la bacteria utilizada, una banda a $3300-3100\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a NH-amida característica de proteína, y otra banda de absorción a 1133 y 993 cm^{-1} que muestra la presencia de polisacáridos.

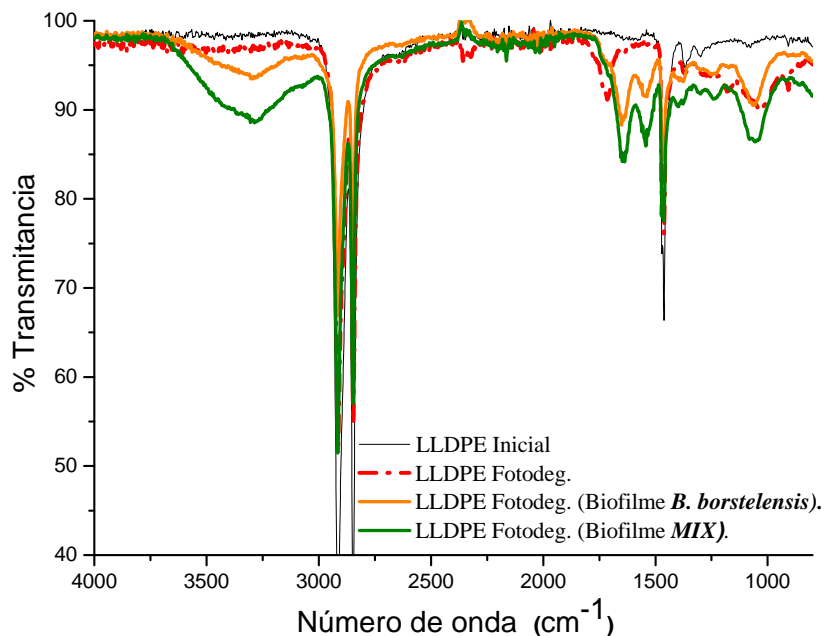


Figura IV.21: Espectros de ATR-FTIR para un filme de LLDPE inicial, fotodegradado (500 horas en SUNTEST) y después de 7 días de exposición bacteriana.

IV.3.2. Biodegradación de filmes de polietileno fotodegradados y termodegradados.

La medida de ángulo de contacto empleando agua como fase líquida permite determinar la formación de biofilm en la superficie de los materiales en términos de variaciones del carácter hidrofílico o hidrofóbico. Para todas las muestras fotodegradadas se han obtenido valores menores de ángulo de contacto, que disminuyen notablemente tras el tratamiento biótico y, en particular en el caso de los filmes conteniendo pro-oxidantes. Además del ángulo de contacto (θ), en la **Tabla IV.12** se incluye el valor de la tensión superficial de adhesión (τ) calculado según se indicó anteriormente (**apartado III.7.8**).

Tabla IV.12: Datos de medidas de ángulo de contacto (θ) y tensión superficial de adhesión (τ) obtenidos con los filmes agrícolas empleando agua como fase líquida.

Medidas de ángulo de contacto	Inicial	Fotodegradado		B. borstelensis		MIX	
	θ	θ	τ	θ	τ	θ	τ
LLDPE	99,1° ± 0,7°	90,8° ± 1,2°	0	76,2° ± 2,0°	17,4	72,2° ± 3,0°	22,2
LLDPE-Fe	97,3 ± 1,9°	89,9° ± 4,1°	0.1	74,3° ± 3,0°	19.7	63,9° ± 3,8°	32,0
LLDPE-Ca	97,7° ± 2,1°	89,9° ± 2,6°	0.1	75,4° ± 2,4°	18,3	70,7° ± 0,6°	24,1

(τ en dyn/cm.)

Se ha observado como la fotodegradación induce la oxidación de los filmes de polietileno y como la presencia de aditivos pro-oxidantes aumenta la formación de especies de oxidación. En primer lugar se comparará los resultados de biodegradación de los materiales con Ca y Fe.

Filmes de polietileno previamente fotodegradados durante un período de 500 horas de envejecimiento acelerado y después de 90 días de biodegradación bacteriana han sido estudiados mediante análisis dinámico de emisión de quimioluminiscencia en atmósfera de nitrógeno (**Anexo 1-Tabla 5**). Se observa como el onset de emisión de quimioluminiscencia se desplaza a menores temperaturas en todas las muestras biodegradadas y en general aumenta la intensidad de emisión de los picos que aparecen a bajas temperaturas (**Figura IV.22**).

En los filmes de polietileno biodegradados con estearatos de Ca y Fe se observaron dos picos de emisión por debajo de 100°C y en general, las temperaturas de onset de emisión se desplazaron a menores temperaturas respecto a los materiales sin aditivos pro-oxidantes. Las temperaturas de onset encontradas para las muestras biodegradadas a 45°C son más bajas que para las muestras biodegradadas a 30°C, resultado que confirma una mayor actividad oxidante de los microorganismos a 45°C (Abrusci, C. y cols. 2007a; Abrusci, C. y cols. 2004b).

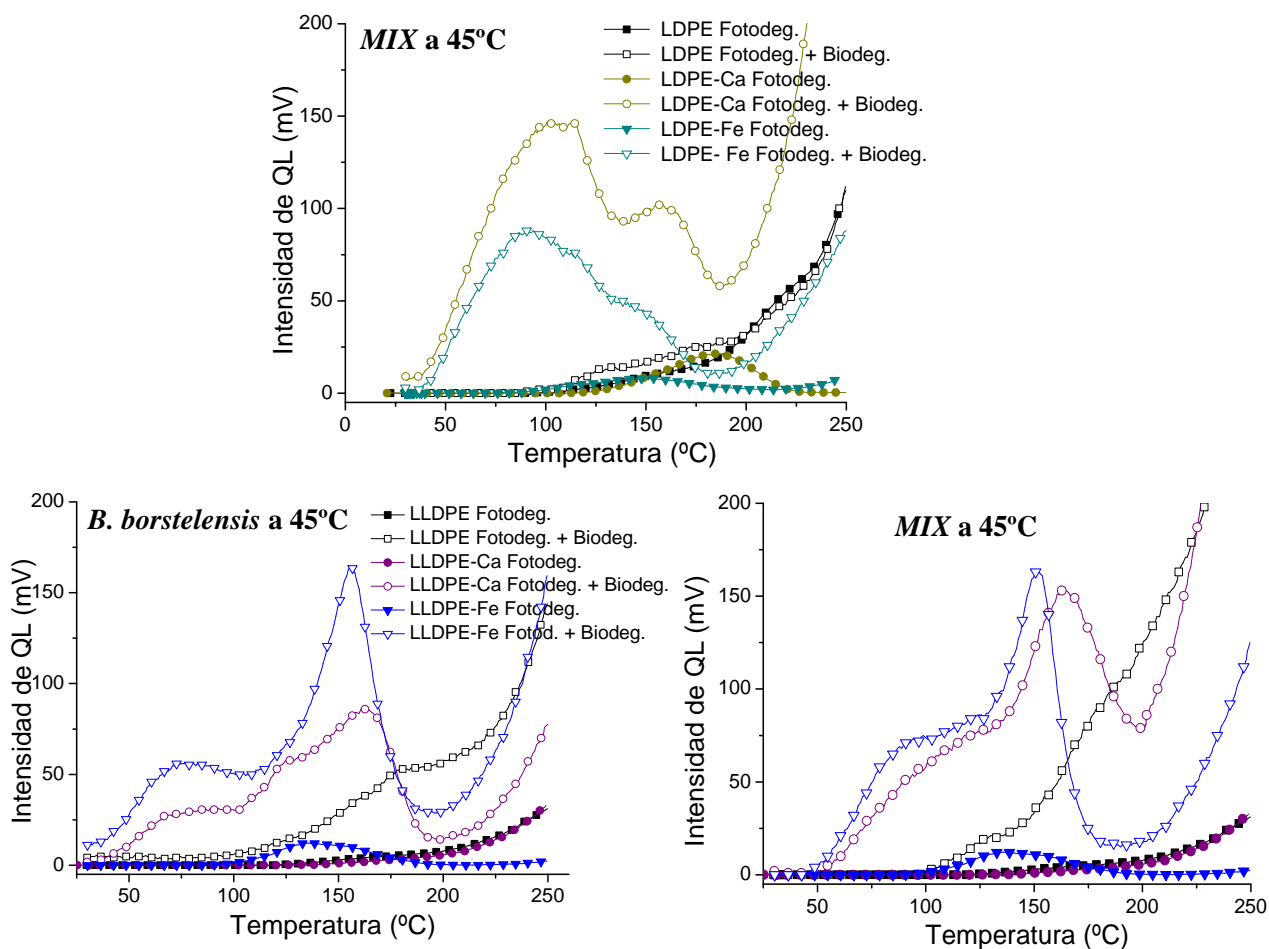


Figura IV.22: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para filmes de polietilenos biodegradados (previamente fotodegradados 500 horas).

Se ha estudiado la variación de las distribuciones de pesos moleculares para el LDPE en ausencia y en presencia de estearato de hierro como aditivo pro-oxidante (**Figura IV.23**) tras el proceso de degradación abiótica y biótica. Se observa un cambio significativo, sobre todo en presencia de estearato de hierro. Tras 90 días de biodegradación la distribución de pesos moleculares, en el caso de la mezcla de *Bacillus* MIX se desplaza poniendo de manifiesto una pequeña disminución del peso molecular, de un 5,6 % en el M_w . En el caso de *B. borstelensis* a 45°C se observa un resultado similar (6,0 % en el M_w).

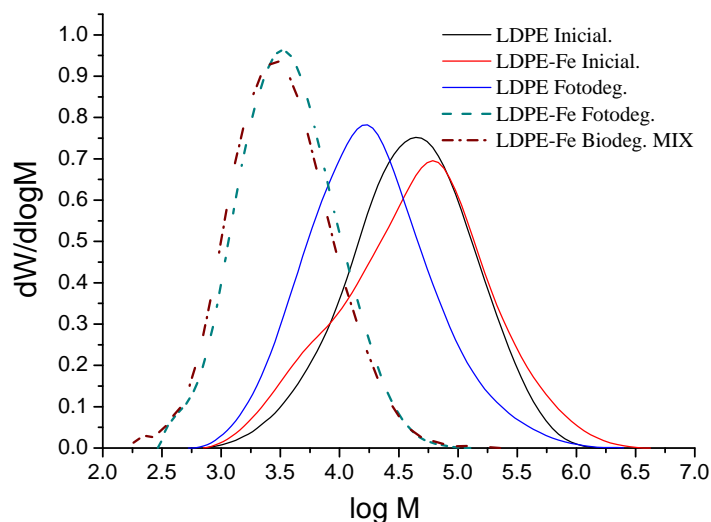


Figura IV.23: Distribución de pesos moleculares para LDPE inicial y LDPE-Fe inicial, fotodegradado y biodegradado a 45°C por MIX.

Para confirmar la biodegradación de los productos de bajo peso molecular formados en la primera etapa de degradación abiótica se realizó un análisis cuantitativo de los productos de degradación tras un proceso de extracción consistente en un tratamiento de los filmes con cloroformo y empleando ultrasonidos (Contat-Rodrigo, L. y cols 2001). Los productos extraídos de las muestras de filmes de polietileno iniciales, fotodegradados (500 horas) y biodegradados fueron analizados mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS), obteniendo los siguientes cromatogramas (**Figura IV.24**). Los productos de degradación extraídos de los PE fotodegradados fueron básicamente hidrocarburos (saturados e insaturados) y alcoholes, mostrando gran concentración en el extracto de los filmes fotodegradados y prácticamente nula en el biodegradado, como se aprecia en la **figura IV.24**.

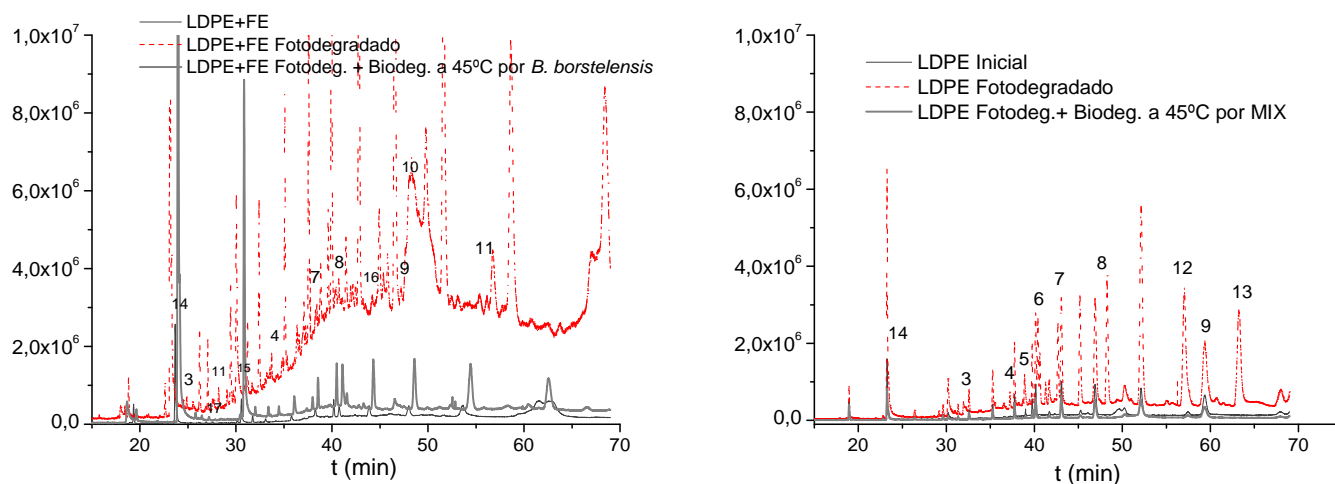


Figura IV.24: Cromatogramas GC-MS de productos de bajo peso molecular extraídos de muestras de polietilenos.

Los resultados de biodegradación de los polietilenos fotodegradados se confirman mediante análisis de FTIR-ATR, donde se observa la disminución de los valores de índice de grupo carbonilo, que es más significativa en presencia de estearatos. (**Tabla IV.13**).

Tabla IV.13: Valores de índice de grupo carbonilo y variación porcentual (Δ %) tras 90 días de biodegradación.

Análisis de FTIR	Inicial	Fotodeg.	<i>B. borstelensis</i>		MIX	
			30°C (Δ %)	45°C (Δ %)	30°C (Δ %)	45°C (Δ %)
LDPE	0,041	0,142	0,133 (-6)	0,124 (-12)	0,139 (-2)	0,102 (-28)
LDPE-Ca	0,034	0,424	0,397 (-6)	0,291 (-31)	0,406 (-4)	0,262 (-38)
LDPE-Fe	0,034	0,467	0,134 (-71)	0,098 (-79)	0,217 (-53)	0,075 (-85)
LLDPE	0,036	0,234	0,126 (-46)	0,095 (-59)	0,127 (-46)	0,095 (-59)
LLDPE-Ca	0,061	0,147	0,086 (-41)	0,048 (-67)	0,102 (-30)	0,085 (-42)
LLDPE-Fe	0,046	0,309	0,104 (-66)	0,046 (-85)	0,150 (-51)	0,076 (-75)

(Δ %: variación porcentual con respecto al índice de carbonilo del filme fotodegradado)

La biodegradación en cuanto a mineralización de los filmes fotodegradados de polietileno se estudió mediante la determinación del CO₂ producido durante la acción

metabólica de la bacteria usando la técnica de medidas indirectas de impedancia. Los resultados obtenidos confirman que la biodegradación de los materiales a 30°C durante 90 días con MIX y *B. borstelensis* fue extremadamente lenta, con mineralizaciones comprendidas en el intervalo de 0,7-1,2%, sin encontrar diferencias apreciables entre los diferentes materiales fotodegradados. En cambio, los resultados obtenidos en la mineralización a 45°C de los materiales fotodegradados, temperatura que se acerca más a la temperatura real extrema del campo de cultivo, muestran diferencias apreciables (**Figura IV.25**) después de los 90 días de biodegradación en función de las formulaciones de los diferentes materiales.

La biodegradación con la mezcla de *Bacillus* MIX muestra una gran diferencia en los polietilenos sin aditivos pro-oxidantes (2-2,5% de biodegradación en 90 días) respecto a los materiales con aditivos (7-10% de biodegradación en 90 días).

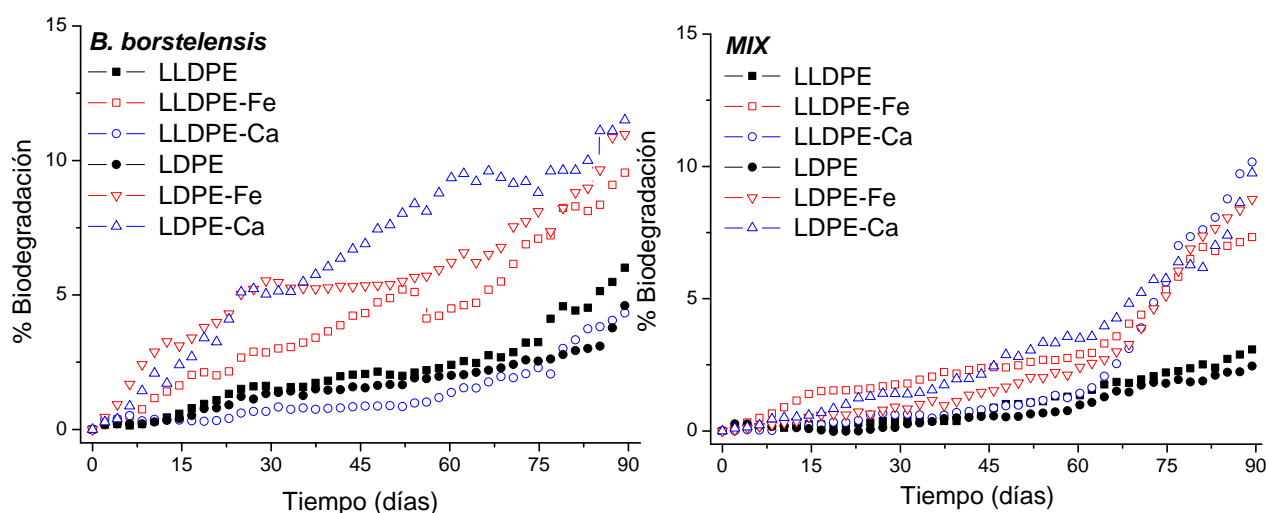


Figura IV.25: Mineralización a 45°C, determinada por valoración de CO₂ empleando medidas indirectas de impedancia, en la biodegradación de filmes de polietilenos fotodegradados por la cepa *B. borstelensis* y la mezcla de *Bacillus*, MIX.

Se encontró que usando *B. borstelensis* el orden de efectividad en la biodegradación fue el siguiente: LDPE \approx LLDPE-Ca < LLDPE << LLDPE-Fe < LDPE-Fe \leq LDPE-Ca. El valor más alto fue el obtenido para los materiales LDPE con estearatos de Ca y Fe (11,5% tras 90 días de biodegradación a 45°C).

En las mismas condiciones de experimentación se ha estudiado la biodegradación de los filmes de LDPE con estearatos de Co y Mn fotodegradados durante 240 horas y se han comparado con los obtenidos utilizando estearato de Fe como aditivo pro-oxidante.

Se ha observado de forma análoga a los materiales estudiados anteriormente, desplazamientos de las distribuciones y disminución de los pesos moleculares promedio obtenidos por GPC.

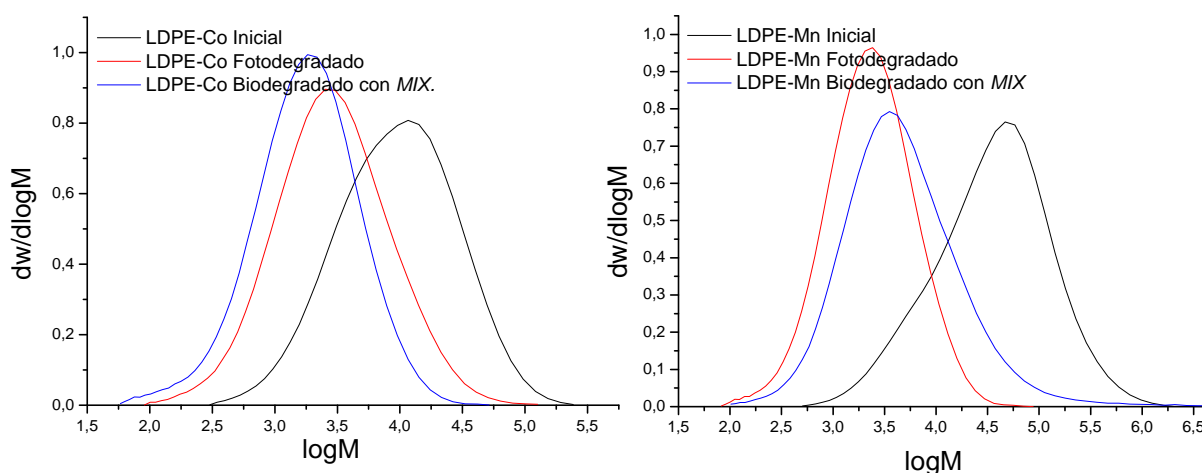


Figura IV.26: Distribuciones y valores de pesos moleculares promedio en número (Mn) obtenidos por GPC para los filmes con estearatos de Co y Mn.

	Inicial			Fotodegradado			Fot. + Biod. MIX		
	Mn	Mw	PD	Mn	Mw	PD	Mn	Mw	PD
LDPE-Co	4714	15076	3,19	1469	4527	3,08	907	2480	2,73
LDPE-Mn	13007	67913	5,22	1250	3283	2,62	1961	22705	11,57

El importante cambio en la distribución de pesos moleculares es debido a la eficiente fragmentación del polímero en el proceso de fotodegradación y a la posterior biodegradación de fragmentos de bajo peso molecular, (**Figura IV.26**).

Mediante un análisis de emisión de QL, se ha observado un efecto similar al descrito anteriormente con los pro-oxidantes de Ca y Fe (**Figura IV.22**), con la aparición de picos a temperaturas de onset menores que en los materiales fotodegradados, debido a la oxidación que produce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) procedentes del metabolismo microbiano (**Figura IV.27, Tabla IV.14**).

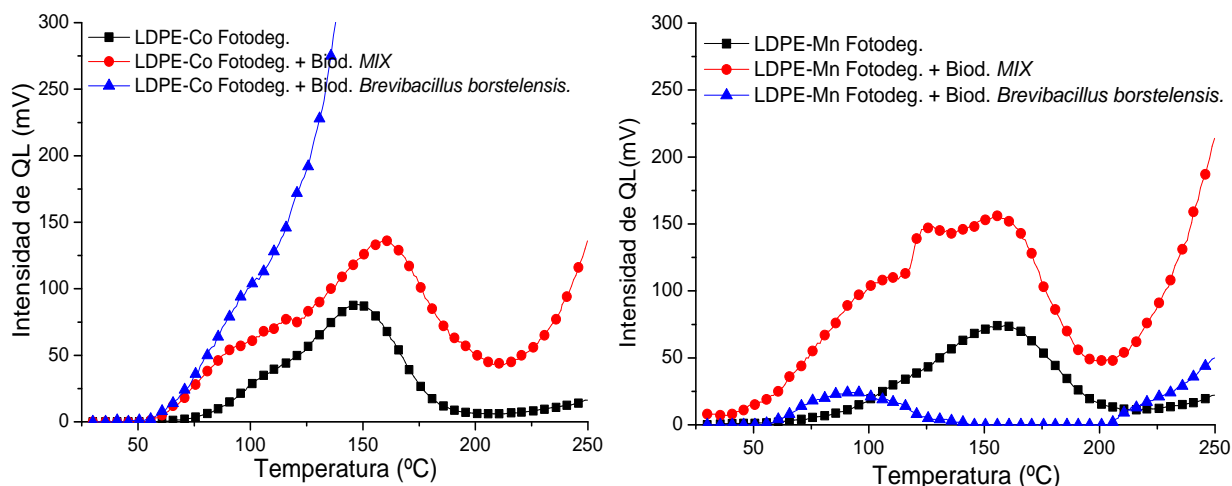


Figura IV.27: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para materiales con estearatos de Co y Mn tras 90 días de degradación biótica.

Tabla IV.14: Datos de temperatura de máximo de emisión y onset de quimioluminiscencia para las medidas de rampa de nitrógeno en muestras de polietileno.

Análisis de QL	Fotodeg.	<i>B. borstelensis</i> / 90 días/ 45°C	MIX / 90 días/ 45°C			
	T (°C) Onset	T (°C) Onset	T _{max} (°C)	T _{Onset} (°C)	T _{max-1} (°C)	T _{max-2} (°C)
LDPE	106	90	-	90	-	-
LDPE-Fe	101	40	120	38	95	160
LDPE-Co	62	53	94	55	91	137
LDPE-Mn	74	58	88	44	10	154

De la misma forma que en el resto de materiales estudiados anteriormente (**Tabla IV.13**), se ha observado también con los filmes que contienen estearatos de Co y Mn, una drástica disminución del índice de grupo carbonilo. De nuevo se ha puesto de manifiesto una disminución más acusada de los valores de índice de grupo carbonilo para los materiales biodegradados durante 90 días a 45°C en presencia de estearatos (**Tabla IV.15**).

Tabla IV.15: Valores de índice de grupo carbonilo para materiales biodegradados 90 días a 45°C.

Materiales	Inicial	Fotodeg.	<i>B. borstelensis</i>	MIX
			45°C ($\Delta\%$)	45°C ($\Delta\%$)
LDPE	0,041	0,14	0,124 (-12)	0,102 (-28)
LDPE-Fe	0,035	0,40	0,098 (-79)	0,075 (-85)
LDPE-Co	-	0,38	0,01 (-97)	0,07 (-91)
LDPE-Mn	-	0,29	0,05 (-81)	0,09 (-76)

(Δ %: variación porcentual con respecto al índice de carbonilo del filme fotodegradado)

Los resultados del estudio de la biodegradación mediante valoración de dióxido de carbono por medidas indirectas de impedancia también confirman una mayor mineralización de estos materiales con estearatos de Co y Mn, (**Figura IV.28**).

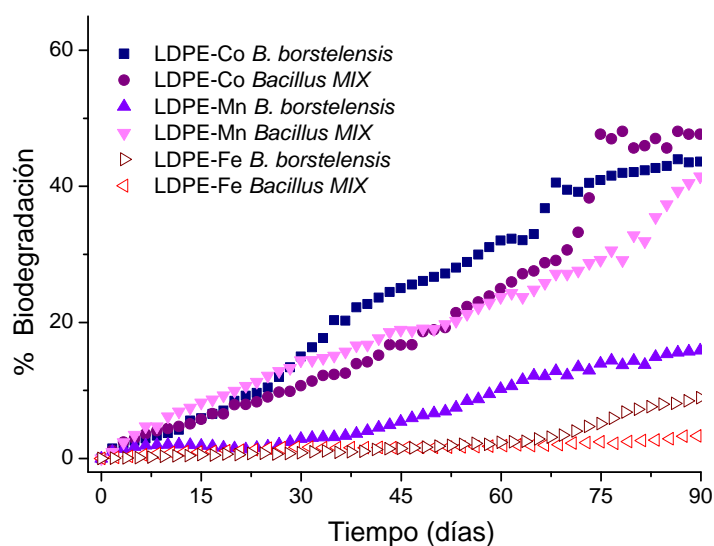


Figura IV.28: Mineralización a 45°C, determinada por valoración de CO₂ empleando medidas indirectas de impedancia, en la biodegradación de filmes de polietilenos con Fe, Co y Mn fotodegradados.

Se observa cómo se alcanzan porcentajes de mineralización del 43,6 % y 47,6 % en los materiales con estearato de Co y del 15,7 % y 41,12 % para los materiales con estearato de Mn con *B. borstelensis* y MIX respectivamente, siendo más eficaz la biodegradación utilizando la mezcla de *Bacillus*. Se aprecia una degradación biótica mucho más eficiente que para los materiales con estearato de Fe.

Este estudio de biodegradación se ha extendido también a los filmes de polietileno con estearatos de Co y Mn previamente termo-degradados a 70 °C durante 216 horas (**Apartado IV.2.2**) y tomando como referencia el que contiene estearato de Fe. Utilizando la valoración de dióxido de carbono por medidas indirectas de impedancia se ha determinado la mineralización de los filmes termo-degradados conteniendo Fe, Co y Mn (**Figura IV.29**).

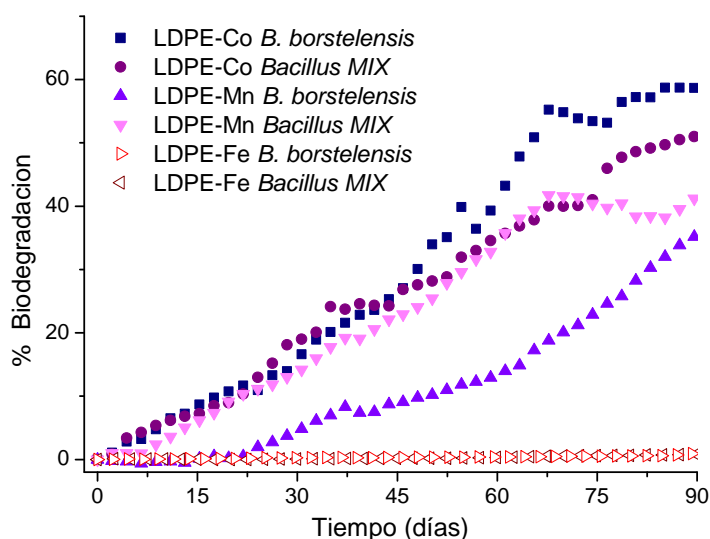


Figura IV.29: Mineralización a 45°C, determinada por valoración de CO₂ empleando medidas indirectas de impedancia, en la biodegradación de filmes de polietilenos con estearatos de Fe, Co y Mn termo-degradados 9 días a 70 °C.

Tras 90 días de experimento de biodegradación se han encontrado niveles de mineralización muy elevados (**Figura IV.29**) para los materiales con estearato de Co del 59,2 % y 51,2 % y sensiblemente menores para el caso del Mn, de un 35,4 % y un 41,5 % para *B. borstelensis* y MIX respectivamente, mientras que los materiales con estearato de Fe no han experimentado cambios apreciables.

IV.3.3. Biodegradación de copolímeros EVA fotodegradados.

Siguiendo la sistemática de estudio del apartado anterior referido a la biodegradación de filmes de acolchado de polietileno, se ha llevado a cabo el estudio de la biodegradación del copolímero EVA fotodegradado y conteniendo estearatos de Ca y Fe (Abrusci, C. y cols. 2012). Como se puso de manifiesto el importante papel de la temperatura en la

biodegradación, el estudio de estudio de biodegradación de los filmes de EVA se ha realizado solamente a 45°C.

Tras 90 días de biodegradación bacteriana se midieron los valores de índice de grupo carbonilo (CI), observando una gran reducción de éstos en los materiales previamente fotodegradados. En particular, los porcentajes de reducción fueron más elevados en el caso de los filmes con aditivos pro-oxidantes (**Tabla IV.16; Anexo 1 – Figura 3**).

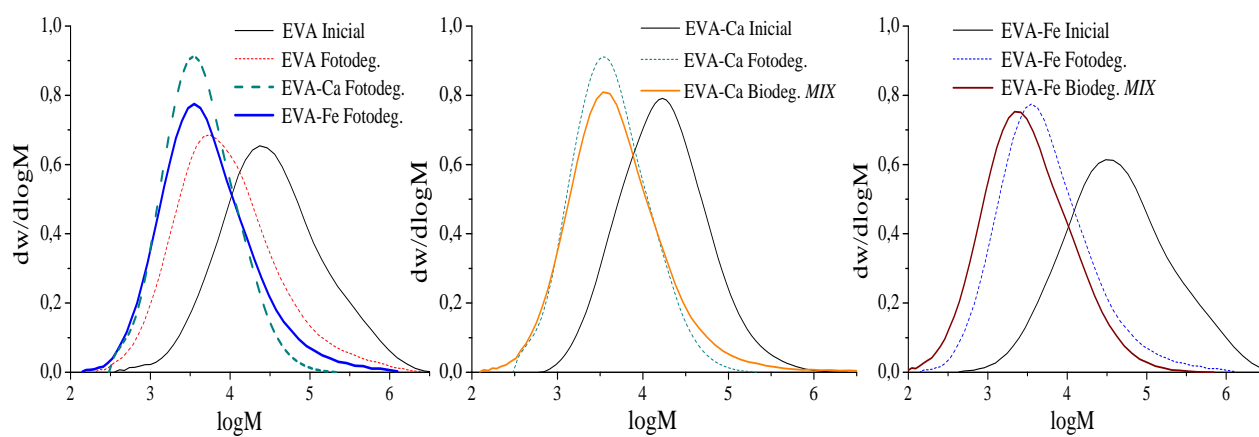
Tabla IV.16: Valores de CI de filme de EVA (fotodegradado) biodegradados 90 días a 45°C con la mezcla de *Bacillus* MIX y la cepa *B. borstelensis*.

Análisis de FTIR	A ₁₇₃₅ /A ₂₈₅₀			A ₁₇₁₅ / A ₂₈₅₀		
	Fot.	MIX	B.bors.	Fot.	MIX	B.bors.
EVA	0,28	0,11	0,07	0,10	0,04	0,02
EVA-Ca	0,44	0,08	0,08	0,28	0,06	0,05
EVA-Fe	0,44	0,16	0,10	0,25	0,16	0,03

Análisis de FTIR	A ₁₂₃₈ / A ₂₈₅₀			A ₁₁₇₅ / A ₂₈₅₀		
	Fot.	MIX	B.bors.	Fot.	MIX	B.bors.
EVA	0,33	0,16	0,10	0,08	0,06	0,05
EVA-Ca	0,53	0,11	0,09	0,14	0,08	0,04
EVA-Fe	0,46	0,21	0,14	0,17	0,11	0,08

El esquema general del mecanismo de degradación abiótica se mostró anteriormente (**Figura I.6**). La oxo-biodegradación de las cadenas de EVA comienza con la primera etapa de fotooxidación (abiótica) que induce la desacetilación y la formación de hidroperóxidos, así como la formación de especies carbonílicas (grupos carbonilo cetónicos) junto con una disminución del peso molecular, consecuencia de las reacciones de fragmentación de la cadena del copolímero. A continuación pasamos a detallar los resultados obtenidos en la segunda etapa de biodegradación, realizada con los filmes de EVA fotodegradados.

Después de 90 días de biodegradación por la mezcla de *Bacillus*, MIX y por la cepa *B. borstelensis* se estudiaron los filmes por GPC para determinar las distribuciones y valores de pesos moleculares promedio, comparando los resultados con los obtenidos para los materiales iniciales y fotodegradados (**Figura IV.30**).



Análisis de GPC	Fotodeg.			Fotodeg. + Biodeg. MIX		
	M_n	M_w	PD	M_n	M_w	PD
EVA	3428	29068	8,47	-	-	-
EVA-Ca	2803	6676	2,80	2206	51273	23,24
EVA-Fe	2283	14237	6,23	1380	6706	4,85

Figura IV.30: Distribuciones y valores de pesos moleculares obtenidos por GPC para filmes de EVA previamente fotodegradados y después de 90 días de biodegradación por la mezcla de *Bacillus* MIX.

Para confirmar la biodegradación de los fragmentos de bajo peso molecular generados durante la primera etapa de degradación abiótica se realizó, al igual que con los polietilenos, una extracción y análisis de los productos extraídos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Todo ello se realizó, tanto para los filmes iniciales, como para los fotodegradados y biodegradados por MIX y por *B. borstelensis*, observando resultados similares para ambos casos (**Anexo 1 - Figura 4**) (Kawai, F. y cols. 2004; Chiellini, E. y cols. 2003; Abrusci, C. y cols. 2011).

Como se ha visto anteriormente, las medidas de emisión de quimioluminiscencia nos permiten evaluar la oxidación producida por los microorganismos en superficies de polímeros (Abrusci, C. y cols. 2009) por la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). De la misma forma, se ha estudiado la emisión de quimioluminiscencia con la temperatura en filmes de EVA biodegradados 90 días en atmósfera de nitrógeno (**Figura IV.31**).

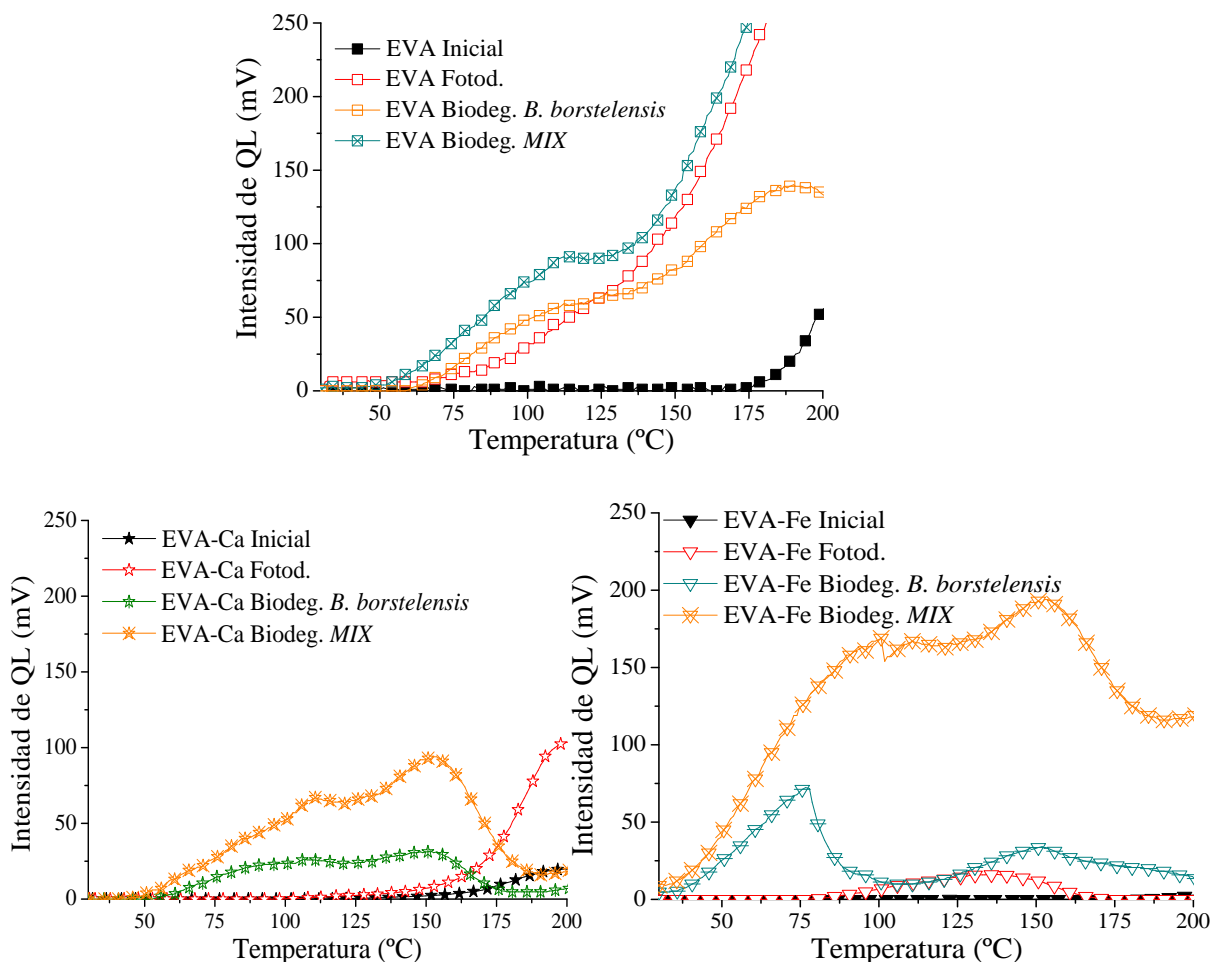


Figura IV.31: Curvas de emisión de quimioluminiscencia frente a la temperatura en atmósfera de nitrógeno para filmes de EVA iniciales, fotodegradados y biodegradados 90 días a 45°C.

El onset de emisión se desplaza a temperaturas menores para las muestras biodegradadas y en general, la intensidad del pico de menor temperatura aumenta. En casi todos los filmes de EVA con estearatos de Fe y Ca aparecen dos picos de emisión y sus temperaturas de onset fueron significativamente más bajas que las medidas para el filme de EVA sin pro-oxidantes. Estos resultados confirman en los filmes de EVA la actividad oxidativa de los microorganismos a través de las especies ROS, de la misma forma que se observó en el polietileno.

También se estudió la mineralización de filmes de los filmes de EVA fotodegradados mediante la determinación del CO_2 empleando la técnica de medidas indirectas de impedancia. El % de biodegradación alcanzado durante la mineralización de las muestras a 45°C de los filmes de EVA (fotodegradados) utilizando la mezcla de *Bacillus* MIX y *B. borstelensis*, se muestra en (Figura IV.32).

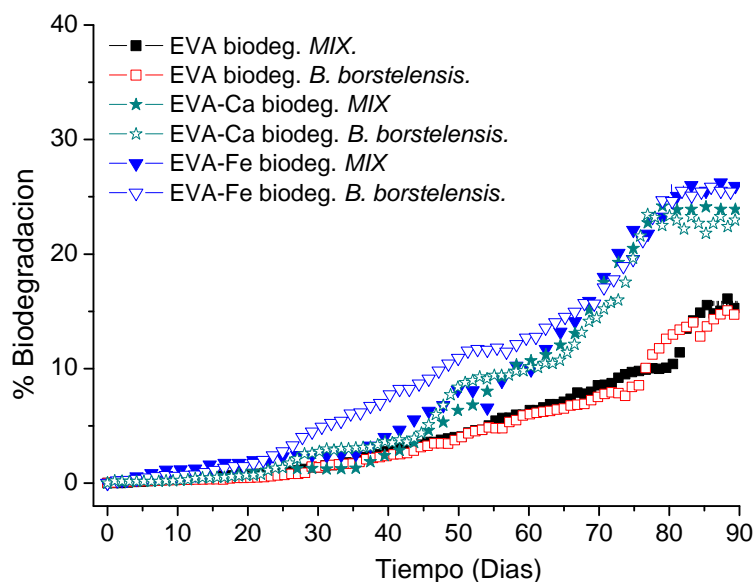


Figura IV.32: Mineralización a 45°C , determinada por valoración de CO_2 empleando medidas indirectas de impedancia, en la biodegradación de filmes de EVA con Ca y Fe fotodegradados.

La biodegradación de EVA fotodegradado comienza desde el principio del bioensayo y la producción de CO_2 es más rápida en presencia de estearatos (15% de biodegradación para EVA, y 23-26% para EVA-Fe y EVA-Ca). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la actividad de *Bacillus* MIX y *B. borstelensis* en EVA fotodegradado, no observando diferencias significativas entre ambas.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN.

Los filmes agrícolas de acolchado se basan principalmente en polietileno, material inerte debido al carácter hidrofóbico de su superficie y a su elevado peso molecular difícilmente asimilable por el metabolismo microbiano. En este Trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la degradación medioambiental de estos materiales en dos fases bien diferenciadas: una primera fase de degradación abiótica (fotoquímica o térmica) y una segunda fase posterior de degradación biótica (biodegradación por bacterias). Uno de los aspectos importantes en este estudio de la biodegradabilidad de filmes agrícolas para acolchado es la posibilidad de establecer una extensión real de los resultados obtenidos en el laboratorio a una aplicación en el campo de cultivo. A continuación vamos a ir discutiendo los diferentes resultados obtenidos y que se han expuesto con detalle en el Capítulo anterior (**IV. Resultados**).

V.1. Aislamiento e identificación bacteriana y formación de biofilme.

El análisis de los materiales iniciales de LDPE enterrados en un campo de cultivo (Región de Murcia) durante 30 días, muestra ausencia de adhesión bacteriana en la superficie de los filmes. Sin embargo, en el caso de los filmes previamente fotodegradados (500 horas de irradiación) y expuestos en el campo en las mismas condiciones que los iniciales, se han podido desarrollar bacterias adheridas en condiciones de cultivo.

Mediante la comparación de las secuencias 16S rRNA de las tres cepas aisladas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank (National Centre for Biotechnology Information) se han conseguido identificar (Abrusci, C. y cols. 2012) tres especies diferentes capaces de adherirse a la superficie del material fotodegradado, *Bacillus cereus* (GU269268.1) con 100% de similitud (Sudhakar, M. y cols 2008), *Bacillus megaterium* (GQ927173.1) con 99 % de similitud (Song, Y. y cols. 2012) y *Bacillus subtilis* (GQ305125.1), con 100% de similitud, todas ellas (**Tabla IV.1; Figura IV.2**) muy comunes en aire, suelos y agua.

Las tres cepas identificadas son del género *Bacillus*, hecho que confirma su ubicuidad debido al amplio intervalo de características fisiológicas y la capacidad que tienen para degradar sustratos de diferentes naturalezas (Claus, D. y cols. 1986). Forman endosporas que son unas estructuras de especial resistencia a las condiciones adversas del medioambiente, como es el caso del campo de cultivo agrícola donde las oscilaciones de temperatura y humedad son muy extremas. También, las bacterias del género *Bacillus* se caracterizan por ser bastante resistentes a antibióticos, desinfectantes y otros productos químicos como pueden ser los pesticidas que se emplean en agricultura.

Es importante resaltar, que nuestro resultado en la identificación de bacterias es similar al obtenido por Watanabe (Watanabe, T. y cols. 2009). Después de analizar la tierra adherida a los filmes de acolchado de LDPE enterrados 6 meses en un campo de cultivo en Japón, aíslan 21 cepas bacterianas diferentes de los géneros *Bordetella* (1 cepa), *Neisseria* (2 cepas), *Moraxella* (3 cepas), *Flavobacterium* (2 cepas), *Acinetobacter* (1 cepa) y *Bacillus* (3 cepas). Empleando filmes fotodegradados en exteriores durante 6 semanas y en ensayo de laboratorio (medio líquido a 28°C durante 1 y 3 meses), solo las tres cepas de *Bacillus* (*B. circulans*, *B. brevis*, and *B. sphaericus*) fueron capaces de mostrar signos de biodegradación en el LDPE fotodegradado.

Después de la identificación realizada y empleando mezcla de *Bacillus* identificados y que denominamos MIX (*B. cereus*, *B. megaterium* y *B. subtilis*), así como, con la cepa *Brevibacillus borstelensis* en experimentos paralelos, se ha reproducido en el laboratorio la exposición de los filmes, iniciales y fotodegradados, a estas bacterias (**Apartado IV.3.1.**). Después de 7 días, la formación de biofilme únicamente se produjo en el material fotodegradado previamente (**Figura IV.20**), hecho que está de acuerdo con el resultado obtenido con las muestras expuestas en el campo de cultivo. Esta adhesión preferente en los materiales oxidados está favorecida por el aumento de hidrofilia que produce la fotodegradación (**Tabla IV.12**), entre otras modificaciones químicas y estructurales en el polietileno que más adelante trataremos, tales como disminución de su peso molecular o la presencia de fragmentos ricos en grupos funcionales, susceptibles del ataque bacteriano. Estos cambios en la naturaleza superficial hacen que, los microorganismos ya puedan utilizar la superficie oxidada de los filmes como fuente de carbono para su metabolismo. La formación de biofilme en

los filmes fotodegradados se ha confirmado por observación en SEM (**Figura IV.20**) e identificado por espectroscopia ATR-FTIR (**Figura IV.21**). La aparición de dos bandas a 1643 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} características de bandas de amida I y II junto con una banda ancha en torno a $3300\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, región perteneciente a la absorción de NH de amidas, permite identificar la presencia de material proteico en la superficie del polímero. La presencia de polisacáridos se detecta en la superficie de los filmes por las bandas características que aparecen en torno a 1133 cm^{-1} y 993 cm^{-1} correspondientes a la bandas de tensión C-O-C de éter glucosídico presentes en los polisacáridos (Reddy, M. M. y cols. 2008; Dai, H. y cols. 2010)

Proteínas y polisacáridos son constituyentes de los exopolímeros producidos por los microorganismos y que forman la estructura del biofilme que recubre las superficies donde se adhieren (Maquelin, K. y cols. 2002; Linos, A. y cols. 2000).

Las bandas infrarrojas características de los exopolímeros adheridos a las superficie del polietileno fotodegradado son idénticas para los biofilmes producidos por MIX y por *B. borstelensis*, aunque difieren en intensidad. En el caso de la mezcla de *Bacillus* la intensidad de las bandas infrarrojas de proteínas y polisacáridos es mayor que en el caso de *B. borstelensis* (**Figura IV.21**) hecho que puede estar relacionado con la presencia de *B. subtilis* en la mezcla. La formación de biofilmes se ha realizado con un inóculo bacteriano idéntico en ambos casos en cuanto a número de células y la producción de biofilme es mayor en la mezcla que contiene los *B. subtilis*. Esta bacteria, en los últimos años se ha utilizado como cepa modelo para el estudio de la formación de biofilmes, precisamente porque generalmente forma biofilmes más robustos y consistentes (Branda, S.S. y cols. 2001; Hamon, M.A. y cols. 2001) que otras cepas generalmente empleadas en laboratorios.

V.2. Degradación fotoquímica y térmica.

V.2.1. Degradación fotoquímica de filmes de polietileno con estearatos de Fe, Ca, Co y Mn.

Como se ha descrito anteriormente, los agentes medioambientales que provocan la degradación de los materiales polímeros son diversos y actúan de forma combinada, aunque en el caso particular de filmes para aplicación agrícola, la temperatura y la radiación UV son factores determinantes en la vida útil de los materiales. En este Trabajo, se ha estudiado el efecto catalítico de aditivos pro-oxidantes en la degradación de los filmes, que pueden acelerar la oxidación fotoquímica y térmica, dando lugar a una reducción del peso molecular hasta niveles que faciliten el ataque microbiano (Scott, G. y cols. 2001; Kyrikou, I. y cols. 2007; Chiellini, E. y cols. 2003; Roy, P.K. y cols. 2008a y b; Ojeda, T.F.M. y cols. 2009). En primer lugar, los aditivos pro-oxidantes estudiados en este Trabajo fueron el estearato de Fe, pro-oxidante clásico y que se toma como referencia, y el estearato de Ca que hasta la fecha no se había estudiado en esta aplicación pro-oxidante.

Los filmes de polietileno fueron expuestos a la intemperie durante un período de 9 semanas, para los materiales con estearatos se observó un incremento gradual en el número de grietas, seguido de fragmentación de las muestras después de las 9 semanas de análisis, período tras el cual los filmes de LDPE y LLDPE sin pro-oxidantes permanecían visiblemente intactos sin apreciar ninguna pérdida de sus propiedades físicas. Los filmes de acolchado se extienden sobre el terreno para la aplicación durante 2-4 meses, siendo los de menor espesor los que se emplean unos 2 meses. Por ello, los filmes de 25 micras de espesor preparados en este Trabajo se han estudiado a la intemperie durante 9 semanas, tiempo suficiente para evaluar su comportamiento y, en paralelo, con irradiación artificial acelerada.

La actividad de los dos estearatos se ha estudiado a través de la emisión de quimioluminiscencia en los filmes fotodegradados a diferentes tiempos y los resultados obtenidos de aceleración de la degradación fotoquímica se confirman con el análisis de

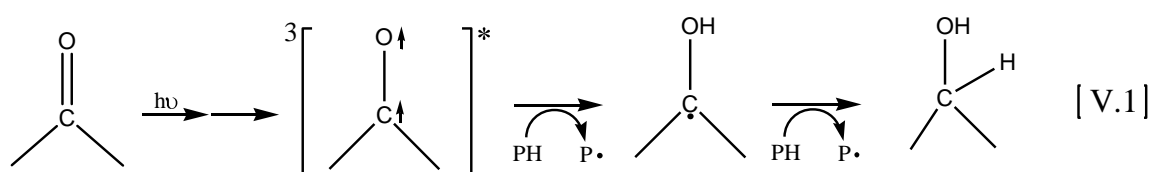
los cambios de peso molecular y de identificación de productos de degradación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS.

Las curvas de emisión de quimioluminiscencia para los materiales iniciales de LDPE y LLDPE (**Figura IV.3.**) muestran un aumento de la intensidad de emisión a temperaturas elevadas superiores a 200°C, sin embargo por efecto de la exposición a la intemperie durante 9 semanas (**Figura IV.4.**) la emisión de quimioluminiscencia empieza a partir de 110°C, temperatura a la que se alcanza el estado fundido, donde la movilidad de los radicales peroxilo formados eficientemente por fotooxidación y su reacción bimolecular de desproporción (**Figura III.8**) responsable de la emisión de quimioluminiscencia en polímeros está favorecida (Corrales, T. y cols. 2009). El efecto de la incorporación de aditivos pro-oxidantes fue muy significativo en los filmes fotodegradados a la intemperie, y en particular, para los materiales LDPE que muestra un pico de emisión de QL a menor temperatura, junto con un mayor desplazamiento del onset de emisión y, en particular, en el caso de los materiales con estearato de Fe.

En general, se observó para el LDPE una mayor emisión de quimioluminiscencia respecto al LLDPE, que puede ser explicarse por la influencia de la estructura ramificada de los polietilenos al considerar el mecanismo de degradación del polietileno (**Figura I.5.**) (Jirackova-Audouin, L. y cols. 1987). En un primer paso de la degradación se produce la formación de radicales alquilo en carbonos secundarios y terciarios por escisión de enlaces C-H, particularmente en el carbono donde se encuentra la ramificación. Después se produce la combinación del radical con el oxígeno del medio y se forman los radicales peroxilos e hidroperóxidos responsables de la quimioluminiscencia. Debido al mayor grado de ramificación en el LDPE, las fragmentaciones de enlaces C-H que implican a un átomo de carbono terciario están más favorecidas que en el caso del LLDPE. Además, deberían tomarse en cuenta otros factores como (i) el polímero es oxidado prácticamente solo en su parte amorfa por lo que un incremento en el grado de ramificación conduce a un aumento de la región interfacial y a una disminución del grado de cristalinidad (**Tabla IV.2**), y (ii) la disminución del peso molecular en LDPE aumenta significativamente la concentración de finales de cadena (enlaces terminales e insaturaciones) que contribuyen a la degradación del polietileno.

Al incorporar el estearato de hierro en ambos polietilenos, el efecto de la degradación es similar, a pesar de que se observa una menor intensidad de QL, por el efecto catalítico del Fe en la descomposición de hidroperóxidos, (**Introducción. Ecuaciones [I.1] y [I.2]**), dando lugar a radicales libres y produciendo la degradación del material durante el procesado (Koutny, M. y cols. 2008; Scott, G. y cols. 2001).

En el caso del estearato de Ca el efecto catalítico en la degradación del polietileno es también significativo, como ponen de manifiesto los resultados de quimioluminiscencia, en LLDPE-Ca el incremento de la QL se desplaza a temperaturas más bajas y, para el LDPE-Ca se observa a baja temperatura un pico de emisión debido a la formación de peróxidos. Este comportamiento pro-oxidante del estearato de calcio descrito por primera vez en polietileno, está de acuerdo con la menor estabilidad fotoquímica observada por otros autores en polipropileno fotodegradado (Benavides, R. y cols. 2003) conteniendo una mezcla de carbonato cálcico y ácido esteárico. Aunque el mecanismo de degradación de los polímeros en presencia de estearato de Ca no está establecido, recientemente, se ha propuesto que los grupos carbonilo generados en la fotooxidación, absorben luz y sus estados excitados tienen estructura de birradical más estabilizado por la presencia de Ca (Fechine, G.J.M. y cols. 2008; Fechine, G.J.M. y cols. 2009). Estas especies serían capaces de capturar hidrógeno de las cadenas de polímero. El proceso sería una reducción del carbonilo a alcohol con captura de dos hidrógenos. La posible reacción de fotorreducción se muestra a continuación.



La fotorreducción de grupos carbonilos a alcoholes favorecida por la presencia de Ca es una reacción que aceleraría la degradación ya que contribuiría a la formación de radicales en el polímero (P·) (**reacción [V.1]**).

El mayor efecto pro-oxidante del estearato de Fe con respecto al de Ca puede relacionarse con el hecho de que los pro-oxidantes basados en metales capaces de tener dos estados de oxidación que difieran en una unidad y de similar estabilidad son los que han demostrado, en recientes estudios, ser más eficientes (Roy, P.K. y cols. 2009). Por

otra parte, puede contribuir que el estearato de Fe tiene un punto de fusión mayor que el de calcio, 177 °C y 155 °C respectivamente, y el aditivo puede mezclarse más fácilmente con el polietileno.

La formación de grupos carbonilos a partir de los peróxidos (**Figura I.5**) en el proceso de degradación se ha seguido por la determinación por FTIR de los índices de grupo carbonilo (CI). De nuevo, el efecto de los pro-oxidantes se aprecia en la evolución del los valores de CI (**Figura IV.5.**) durante las 9 semanas de exposición a la intemperie, y en los filmes de LDPE y LLDPE el CI se mantiene en estado estacionario en clara diferencia a cuando se incorporan los estearatos, pues el incremento es gradual (excepto LLDPE-Ca que permanece estacionario). La incorporación del estearato de hierro produce un aumento mayor del índice de grupo carbonilo y confirma su mayor actividad catalítica respecto al estearato de Ca.

Los filmes agrícolas fotodegradados a distintos tiempos en cámara de envejecimiento acelerado mostraban la misma tendencia descrita en las muestras expuestas a la intemperie. El análisis isoterma de quimioluminiscencia e índice de carbonilo permite observar un aumento de la concentración de especies hidropéroxido con el tiempo de degradación hasta un período de 150-200 horas, a partir del cual disminuye la intensidad de QL y se produce un aumento del índice de carbonilo, lo que indica que la descomposición de hidropéroxidos prevalece sobre su formación (**Figura IV.6.**). En el análisis dinámico de quimioluminiscencia en función de la temperatura se produce un desplazamiento del onset de emisión a menores temperaturas, así como la aparición de picos de emisión correspondientes a la formación de hidropéroxidos (**Figura IV.7.**). En general, para todas las muestras se observa mayor grado de degradación como consecuencia de la mayor radiación total recibida en condiciones artificiales (1375 MJ/m² y 1117 MJ/m² en envejecimiento acelerado y natural, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto la buena correlación de la fotooxidación entre el envejecimiento fotoquímico acelerado y la exposición a la intemperie.

El análisis de los productos extraídos de los polietilenos iniciales y fotodegradados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), permitió la identificación de hidrocarburos de menos de 30 átomos de carbono y el aumento de su concentración cuanto mayor es su peso molecular (**Figura IV.8.**). El contenido relativo

de productos en las muestras iniciales es muy bajo, pero se incrementa muy notablemente en la fotodegradación, lo que indica una formación eficiente y rápida de compuestos de bajo peso molecular debido a la fragmentación del polietileno (**Figura I.5**) durante el envejecimiento fotoquímico, resultado coincidente con otros autores (Contat-Rodrigo, L. y cols. 2001). Los filmes con estearato de Ca fotodegradados contienen productos de bajo peso molecular a concentración superior a la de los polietilenos de referencia pero inferior a la de los filmes con estearato de Fe, en los que la concentración de productos extraídos es muy elevada como consecuencia de su mayor actividad como pro-oxidante.

En los materiales fotodegradados LDPE-Fe y LDPE-Ca, los pesos moleculares determinados por GPC son mucho menores que en el material de referencia LDPE, (**Tabla IV.4**) en el orden de magnitud determinado por otros autores (David, C. y cols. 1992). También se ha observado una disminución de la estabilidad térmica por análisis termogravimétrico (**Tabla IV.3**), como consecuencia de la aparición de fragmentos de bajo peso molecular por el proceso de escisión de cadena.

En los polietilenos con pro-oxidantes, después de la fotodegradación, se observa un aumento de la cristalinidad (**Tabla IV.2**) atribuible a los efectos de reorganización de la fase amorfa por la oxidación y la escisión de cadena que permite la cristalización de cadenas cortas y su incorporación a la fase cristalina. En el caso de LLDPE el efecto es similar.

En una segunda parte del estudio, se ha estudiado la actividad de estearatos de Co y Mn en la degradación fotoquímica de filmes de polietileno de baja densidad (LDPE) (Corti, A. y cols. 2010) y se ha comparado con los resultados obtenidos con los estearatos de Fe y Ca.

Los materiales LDPE-Co y LDPE-Mn tras un período de exposición de 240 horas en la cámara de envejecimiento fotoquímico acelerado se deterioran visiblemente, obteniendo mayores valores de intensidad máxima de emisión y desplazamientos del onset de emisión de quimioluminiscencia a menores temperaturas (**Figura IV.9**) (**Anexo 1-Tabla 1**) que en LDPE-Fe y LDPE-Ca. El análisis termogravimétrico de las muestras fotodegradadas muestra un desplazamiento de la T_{10} y T_{max} respecto a las muestras

iniciales, como consecuencia de la aparición de fragmentos de bajo peso molecular por escisión de cadena, observando una mayor efectividad del estearato de Co y Mn, en la degradación fotoquímica de los filmes (**Tabla IV.5**).

Los valores de índice de carbonilo para las muestras aumentan gradualmente con el tiempo de fotodegradación, alcanzando valores similares a 240 horas para los filmes que contienen estearatos y muy superiores a los obtenidos para LDPE de referencia (**Figura IV.10**).

La determinación de pesos moleculares por GPC (**Tabla IV.6**) pone de manifiesto la eficiente fragmentación del polietileno cuando se incorporan pro-oxidantes en su formulación y en particular, la fotodegradación con pro-oxidantes sigue el orden de eficiencia $Ca < Fe < Mn \leq Co$. También hay que resaltar, un efecto degradante del estearato de Co durante el procesado ya que el LDPE-Co inicial muestra pesos moleculares promedio M_n y M_w muy bajos.. Algunos autores han indicado que se produce reticulación del LDPE en presencia de complejos de Co durante el procesado (Roy, P.K. y cols. 2005). En la preparación de las muestras para GPC en este Trabajo se observó la presencia de geles en el caso LDPE-Co, ello justificaría el peso molecular inicial tan bajo como resultado de un fraccionamiento durante el filtrado.

La foto-oxidación de los filmes se ha evaluado también por el efecto que producen las especies polares de oxidación en el aumento de la hidrofilia con respecto al polietileno. En todos los filmes se observa una disminución del ángulo de contacto para las muestras fotodegradadas respecto a las muestras iniciales (**Tabla IV.7**). En estas medidas no se detectan importantes diferencias entre los filmes referencia y con pro-oxidantes confirmando la actuación principal de los pro-oxidantes degradando en todo el espesor del material y no siendo tan significativo su efecto en la superficie.

En cuanto a la eficiencia como pro-oxidantes en la fotodegradación, los estearatos de Co y Mn, muestran eficiencias superiores a los estearatos de Fe y Ca. Aunque no hay estudios comparativos de los estearatos puros, los estudios realizados en mezclas de complejos de Mn/ Fe y Mn/ Fe/Co ponen de manifiesto el efecto superior de Co y Mn en acelerar la fotodegradación (Fontanella, S. y cols. 2010).

V.2.2. Degradación termo-oxidativa de filmes de polietileno con estearatos de Fe, Co y Mn.

Una vez evaluada la capacidad para acelerar la degradación fotoquímica de los estearatos de Fe, Ca, Co y Mn en polietileno, se ha estudiado su actividad catalítica en la degradación termo-oxidativa del LDPE. Es de gran interés el estudio y desarrollo de aditivos que consigan un alto nivel de oxidación y fragmentación en el polímero para permitir una posterior degradación biótica eficiente, por lo que es más deseable los pro-oxidantes que además de ser foto-iniciadores, tengan la capacidad de poseer también actividad catalítica en la termo-degradación.

En primer lugar se ha estudiado la actividad de los estearatos de Fe y Ca en la oxidación térmica de los polietilenos LDPE y LLDPE, mediante el análisis isoterma de emisión de quimioluminiscencia en atmósfera de oxígeno (**Figura IV.11**). En las curvas obtenidas se observan dos etapas con distinta velocidad de oxidación (Broska, R. y cols. 2001), la primera corresponde a una reacción independiente de la concentración de oxígeno y la segunda a una reacción controlada por la difusión de oxígeno. Cuando el proceso tiene lugar en condiciones de alta concentración de oxígeno y temperatura, el sistema sigue un mecanismo controlado por difusión, y la velocidad de autooxidación aumenta hasta un valor en que la difusión y solubilidad de oxígeno están limitados, teniendo lugar una disminución de la velocidad de oxidación, que se refleja en un cambio de pendiente en la curva. El primer máximo aparece como un hombro de la curva, y el tiempo y la intensidad del segundo máximo es dependiente de la estructura del polímero y de la incorporación de estearatos. Para LDPE se observa mayor intensidad de quimioluminiscencia respecto al LLDPE, asociado al aumento del grado de ramificación. En las muestras de polietileno con aditivos pro-oxidantes la emisión de quimioluminiscencia aumenta drásticamente, y se observa un menor tiempo de inducción a la oxidación (OIT) respecto al polímero puro, atribuido al proceso de descomposición de hidroperóxidos catalizado por los pro-oxidantes, dando lugar a la generación de radicales libres que inician la oxidación del polietileno (**Reacción I.1 y I.2**). La incorporación del estearato de Fe provoca un aumento del grado de oxidación y se obtiene una mayor intensidad de quimioluminiscencia respecto al estearato de Ca, en el que el segundo máximo de emisión aparece a tiempos más largos.

La mayor actividad catalítica de la degradación térmica de los estearatos de Co y Mn con respecto a los de Fe y Ca se pone de manifiesto en el análisis isoterma en atmósfera de oxígeno. Las curvas presentan máximos de emisión a tiempos más cortos y de mayor intensidad respecto a LDPE-Fe y LDPE-Ca. En el caso de LDPE-Co se observa un solo máximo debido al mayor grado de degradación de la muestra, (**Figura IV.12**).

Se han determinado los valores de energías de activación en la degradación térmica (**Figura IV.13**) de las distintas muestras, mediante análisis termogravimétrico a distintas velocidades de calentamiento (Blanco, I. y cols. 2011), que permite estudiar la actividad pro-oxidante de los distintos estearatos. En los termogramas obtenidos se observa para todos los materiales una sola etapa de degradación, asociada a la ruptura al azar como ruta primaria en la degradación de polietilenos. El estearato de Ca no tiene actividad catalítica de la termo-oxidación y por ello se ha utilizado el estearato de Fe como referencia comparativa junto al polietileno. Los valores de energía de activación en los materiales con estearatos de Co y Mn, y en particular para el caso del estearato de Co, muestran su mayor actividad para catalizar procesos de degradación térmica del polietileno a través de la formación de especies de oxidación intermedias cuya descomposición requiere una menor energía de activación en comparación con los procesos de degradación en el polietileno puro. (Roy, P.K. y cols. 2007a y c).

Filmes basados en LDPE han sido degradados a distintas temperaturas en el intervalo 45 a 90°C. En el análisis por FTIR de las muestras termodegradadas se observa un aumento del índice de carbonilo con la temperatura de degradación. A 90°C, para LDPE-Co y LDPE-Mn se observa un aumento gradual del índice de grupo carbonilo hasta un tiempo de degradación de 75 horas en que se produce el deterioro de las muestras, siendo más acusado en presencia de estearato de Co, mientras que para LDPE y LDPE-Fe tras ese período no se observa degradación de los materiales, lo que indica que el estearato de Fe no tiene actividad como pro-degradante térmico (**Figura IV.14 y 15**) al igual que se comprobó con el de Ca. Para temperaturas inferiores se observa un comportamiento similar de los filmes, el estearato de Co muestra gran actividad en la degradación térmica de LDPE, los valores de índice de carbonilo son inferiores a los determinados a 90° y aumentan con el tiempo de degradación hasta las 9 días de tratamiento térmico (216 horas), en que se produce el deterioro de las muestras. A 45°C no se detecta aparición de bandas características de grupos carbonilos cetónicos,

El análisis isoterma de emisión de QL en atmósfera de nitrógeno (**Tabla IV.8**) permite confirmar la eficiente oxidación de los materiales con estearatos de Co y Mn, incluso a bajas temperaturas, en los que no se detecta la formación de grupos. En general, la intensidad de emisión aumenta en las muestras degradadas respecto a las iniciales, siendo este efecto más acusado en el caso de LDPE-Co y LDPE-Mn, y para temperaturas inferiores en las que la formación de hidroperóxidos predomina frente a su descomposición.

Los resultados obtenidos mediante análisis por GPC de las muestras termodegradadas a diferentes temperaturas (**Figura IV.16**) confirman la excelente capacidad de los estearatos basados en Co y Mn como catalizadores de la oxidación térmica de los materiales. Para LDPE y LDPE-Fe no se observa variación de los pesos moleculares con el tratamiento térmico, mientras que LDPE-Co y LDPE-Mn muestran un gran desplazamiento de los cromatogramas a valores inferiores de pesos moleculares incluso a la temperatura de degradación de 60°C, como consecuencia de la ruptura de las cadenas, lo que va a ser decisivo en la posterior degradación biótica de los materiales.

Los resultados de degradación térmica ponen de manifiesto la buena eficiencia de degradación de los estearatos de Co y Mn a temperaturas superiores a 50°C con la concentración de 0,2 % de aditivo empleada en este Trabajo. Ello permite su empleo como filme a temperatura ambiente en aplicaciones de acolchado y envase/embalaje pudiéndose graduar su vida útil variando el espesor y la concentración de aditivo pro-oxidante.

V.2.3. Degradación fotoquímica de copolímeros etileno-acetato de vinilo (EVA) con estearatos de Fe y Ca.

Debido a las ventajas que presenta el uso del copolímero EVA frente a los polietilenos utilizados de forma sistemática en múltiples aplicaciones (Morlat-Therias, S. y cols. 2007) y en particular en filmes agrícolas, se ha estudiado la influencia de la presencia de los grupos acetato de estos copolímeros en la estabilidad fotoquímica de los materiales (degradación abiótica). Para ello se han utilizado filmes de EVA, con un contenido de

grupos acetatos de un 9 % y 25 μm de espesor, aptos para la aplicación de acolchado, sin aditivos y con estearatos de Fe y Ca como aditivos pro-oxidantes.

Tras 432 horas de exposición en la cámara de envejecimiento acelerado se han observado una serie de cambios en su estructura (**Figura I.6**) facilitados en gran medida por la presencia de aditivos pro-oxidantes. La degradación abiótica de estos materiales se ve favorecida por la presencia de los grupos acetato, lo que se traduce en una variación significativa de los espectros de FTIR durante la degradación fotoquímica de los materiales. El análisis de la evolución del índice de grupo carbonilo nos muestra el crecimiento de dos bandas de absorción características: un hombro a 1715 cm^{-1} (**Figura IV.17**) y una banda a 1175 cm^{-1} correspondientes a la aparición de grupos cetónicos formados a partir de fragmentos de acetato de vinilo mediante reacciones de oxidación Norrish I y de ruptura de hidroperóxidos (**Figura I.6**). De forma simultánea se observa una disminución de la banda de absorción de ester (acetato) a 1735 cm^{-1} y la banda de vibración a 1238 cm^{-1} asignada a la banda de tensión asimétrica $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$ (Haken, J.K. y cols. 1971; Haslam, J. y cols. 1972; Allen, N.S. y cols. 2000), y la aparición de una nueva banda a 1780 cm^{-1} correspondiente a la formación de lactona. Se aprecia como la presencia de los estearatos de Fe y Ca aumentan considerablemente el valor de CI después de la fotodegradación (**Anexo 1-Tabla 4**) de manera similar a lo observado para los filmes de acolchado de polietileno.

Después de la degradación acelerada en la cámara SUNTEST (432 horas), se observan cambios drásticos en las curvas de emisión de quimioluminiscencia (**Figura IV.18 y 19**). Para los materiales iniciales la emisión aumenta a temperaturas superiores a 105°C , debido a la mayor movilidad de los hidroperóxidos en estado fundido. Para los filmes que contienen estearatos los inicios de la emisión de quimioluminiscencia (onset) se desplazan a temperaturas inferiores respecto a EVA puro, indicando un mayor grado de oxidación durante el procesado en EVA-Ca y EVA-Fe. Después del período de irradiación, la emisión se desplaza para todas las muestras a menores temperaturas y, en el caso de EVA-Ca y EVA-Fe se observa la aparición de picos característicos de formación de hidroperóxidos a temperaturas bajas debido a la acción de los pro-oxidantes durante la fotodegradación de los materiales, resultados que están de acuerdo con el mayor aumento del índice de grupo carbonilo (Youssef, B. y cols. 2008) analizado mediante ATR-FTIR. (**Figura IV.17**)

Se ha llevado a cabo el estudio de la estabilidad térmica de las muestras fotodegradadas mediante DSC. De manera similar al comportamiento de los polietilenos descrito en el **apartado IV.2.1**, se observa un ligero aumento de la cristalinidad en los materiales fotodegradados debido a que se produce la degradación de la parte amorfa, disminuyendo las interacciones intra/inter-moleculares, lo que permite la reorganización o recristalización de las cadenas (Jin, J. y cols. 2010b; Liu, M. y cols. 1995; Chen, S. y cols. 2009). Mediante los valores de OIT determinados mediante DSC (Tiempo de inducción a la oxidación) se confirma la menor estabilidad de los filmes con aditivos pro-oxidantes en estos copolímeros (**Tabla IV.10**). En el análisis termogravimétrico en atmósfera de nitrógeno, se observan dos etapas de pérdida de peso (**Tabla IV.10**), la primera a temperaturas inferiores a 400 °C debida a la desacetilación autocatalítica de la fracción acetato, y la segunda en el intervalo 400-520 °C correspondiente a la escisión de las cadenas del material. En los filmes iniciales, la primera pérdida de peso (ΔW_1) es del orden del 9%, que se corresponde con el contenido de acetato presente en el filme inicial, lo que indica una eficiente desacetilación (Ayutthaya, S.I.N. y cols. 2008) en la primera etapa de descomposición térmica (**Anexo I – Figura 2**). Tras 432 horas de envejecimiento acelerado, la pérdida de peso en la primera etapa en general aumenta debido a que la presencia de los grupos acetato provoca una mayor oxidación del material, siendo ligeramente superior en los filmes con aditivos pro-oxidantes. En los filmes fotodegradados la desacetilación viene acompañada de la eliminación de unidades terminales activas de las cadenas de bajo peso molecular del EVA. Las temperaturas de 5, 10 y 50 % de pérdida de peso, disminuyen en las muestras de EVA fotodegradadas respecto a las iniciales, lo que confirma que la ruptura de cadena es la responsable de la disminución de la estabilidad térmica. Los máximos de las etapas 1 y 2, analizadas por DTGA no varían con la fotodegradación, indicando que la disminución del peso molecular, analizada por GPC, no afecta la velocidad de descomposición máxima. La presencia de estearatos de Ca y Fe produce una drástica disminución del peso molecular (**Tabla IV.11**), siendo más acusado en EVA-Fe que en EVA-Ca, como se ha observado previamente en LDPE.

V.3. Biodegradación bacteriana de materiales altamente degradados.

La etapa de formación de biofilme es determinante dentro de la eficiencia y desarrollo de los procesos de biodegradación microbiana en todo tipo de materiales poliméricos, y en particular, dentro de las poliolefinas de acolchado. En el apartado V.1 de esta Discusión se detallaron los resultados obtenidos en la formación de biofilme, que solo se producía en los materiales fotodegradados. Por este motivo, y aunque se ha comprobado la nula biodegradación de los polietilenos sin degradar, el Trabajo se ha centrado en el estudio de biodegradación sobre los materiales al final de la degradación fotoquímica o térmica anteriormente discutida.

El estudio de biodegradación se ha realizado empleando técnicas de caracterización de forma comparativa sobre los diferentes filmes fotodegradados y después de someterlos a ensayos de biodegradación. Éstos se han realizado mediante los procedimientos microbiológicos que se describen en el Capítulo de Materiales y Métodos de esta Memoria (**apartado III.5.**), empleando el equipo de medidas indirectas de impedancia para la valoración del dióxido de carbono producido en la mineralización de polietilenos.

Los valores de ángulo de contacto (**apartado III.7.8.**) disminuyen notablemente en los materiales fotodegradados y tras el tratamiento biótico con los diferentes microorganismos utilizados (**Tabla IV.12**), lo que indica el aumento de la hidrofilia de la superficie del polímero debido a la formación de biofilme, que es más acusado para el caso de LLDPE-Fe que, como hemos visto anteriormente, está después de 432 horas de irradiación más fotodegradado que el de Ca. Esta variación de ángulo de contacto con la formación de biofilme en materiales degradados ha sido también descrita en otros casos por otros autores (Xu, L.C. y cols. 2007).

Este aumento de la hidrofilia se evidencia de manera más clara mediante el parámetro τ , tensión superficial de adhesión (**apartado III.7.8**), el cual aumenta de forma drástica en los materiales fotodegradados tras el tratamiento biótico con microorganismos, y particularmente en el caso de biodegradación por la mezcla MIX (*B. cereus*, *B. megaterium* y *B. subtilis*) y en presencia de estearato de Fe. Los resultados obtenidos

estarían de acuerdo con la mayor intensidad de las bandas de FTIR observadas en la formación de biofilme por la mezcla de *Bacillus* respecto a *B. borstelensis*, y que podría atribuirse a la presencia de *B. subtilis* en la mezcla de bacterias como hemos comentado anteriormente (Branda, S.S. y cols. 2001; Hamon M.A. y cols. 2001).

Se ha llevado a cabo el análisis dinámico de emisión de quimioluminiscencia en atmósfera de nitrógeno de las muestras sometidas a 500 horas de fotoenvejecimiento acelerado y posterior biodegradación durante 90 días (**Figura IV.22**). El estudio permite evaluar la acción metabólica de los microorganismos en la superficie del polímero a través de la oxidación inducida por la generación de especies reactivas de oxidación (ROS), tales como, radicales peroxilo, hidroperóxidos, superóxidos de hidrógeno y radicales anión. El efecto de los aditivos pro-oxidantes fue significativo, y el onset de emisión se desplaza a temperaturas inferiores respecto al polietileno puro.

En particular, las muestras biodegradadas a 45°C con estearatos de Fe y Ca presentaron picos de emisión intensos a temperaturas inferiores que las muestras biodegradadas a 30°C, que confirma una mayor eficacia del proceso a 45°C. Este resultado se correlaciona con el análisis por FTIR, en el que se observa que la incubación de los filmes de polietileno fotodegradados daba lugar a una reducción de índice de carbonilo, siendo más acusada la actividad metabólica a 45°C y en presencia de estearato de hierro (**Tabla IV.13**). Este hecho sería atribuido a la asimilación preferencial por parte de los microorganismos, de los grupos ester/carbonilo generados durante la oxidación abiótica. La oxobiodegradación de polietileno implica una primera etapa de foto- y termo-oxidación, en la que se generan hidroperóxidos y especies carbonilo, que dan lugar a la disminución de pesos moleculares por reacciones de escisión de cadena. En una segunda etapa, la degradación por microorganismos da lugar a la disminución de grupos carbonilo debido a la formación de ácidos carboxílicos. (Albertsson, A.C. y cols. 1987; Hakkarainen, M. y cols. 2004).

Para confirmar la biodegradación de los productos de bajo peso molecular generados en la etapa abiótica, se analizaron por cromatografía de gases los productos extraídos de las muestras iniciales, fotodegradadas y después de 90 días de biodegradación de las mismas. Después del ensayo de biodegradación, en el extracto de los filmes biodegradados, los productos de bajo peso molecular desaparecen casi en su totalidad

hasta los niveles del material inicial, hecho que puede atribuirse al uso de estos productos de bajo peso molecular como fuentes de carbono por los microorganismos utilizados, *B. borstelensis* y el consorcio de *Bacillus* MIX (**Figura IV.24**).

Mediante la determinación de pesos moleculares y distribuciones por GPC, se observa un ligero desplazamiento de la distribución de pesos moleculares a valores inferiores para las muestras biodegradadas (**Figura IV.23**). Este resultado confirmaría que las bacterias empleadas en este Trabajo biodegradan los productos de bajo peso molecular extraíbles junto con la fracción de pesos moleculares menores de 5000 Da. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Chiellini, E. y cols. 2003; Kawai, F. y cols. 2004).

La biodegradación de los polietilenos se ha estudiado mediante la determinación del CO₂ producido durante la acción metabólica de las cepas bacterianas empleando la técnica de medidas indirectas de impedancia (**apartado III.5**). Los estudios de biodegradación se realizaron inicialmente a dos temperaturas 30 y 45°C con LDPE y LLDPE, el primer resultado que hay que resaltar es el importante efecto de la temperatura en la mineralización de los polietilenos fotodegradados. La biodegradación a 30°C por las cepas *B. borstelensis* y MIX de los filmes fotodegradados fue muy lenta y con valores de mineralización comprendidos entre 0.7-1.2% después de 90 días de bioensayo. Por este motivo y por la poca posibilidad de ver diferencias entre los diferentes materiales, el resto de estudios en este Trabajo se llevo a cabo a 45°C donde las cepas identificadas en este Trabajo (*B. cereus*, *B. megaterium* y *B. subtilis*), han mostrado una biodegradación mucho más eficiente y comparable con la cepa *B. borstelensis* que ya ha demostrado su eficiencia para biodegradar a 50 °C (11 % de pérdida de peso en 30 días) polietileno fotodegradado (60 horas) con prooxidante cuya naturaleza y concentración no se especifica (Hadad y cols. 2005).

La representación del % de mineralización a 45 °C de los materiales con el tiempo de biodegradación (**Figura IV.25**), indica que la biodegradación de los materiales comienza en la primera semana, siendo la producción de CO₂ más rápida en el caso de *B. borstelensis* y en particular, cuando están presentes los estearatos de Fe y Ca.

La biodegradación alcanzada en los polietilenos es mayor, tanto con *B. borstelensis* como con *Bacillus* MIX, en los polietilenos fotodegradados que contienen pro-oxidantes respecto a los polietilenos sin pro-oxidantes. En general, la biodegradación es superior en el polímero con mayor grado de ramificación (LDPE).

El orden de biodegradación alcanzado después de 90 días de ensayo con las bacterias estudiadas es similar al orden de fotodegradación encontrado en este estudio, se muestra a continuación:

B. borstelensis: LDPE \approx LLDPE-Ca < LLDPE << LLDPE-Fe < LDPE-Fe \leq LDPE-Ca

***Bacillus* MIX**: LDPE \leq LLDPE <<< LLDPE-Fe < LDPE-Fe < LDPE-Ca \approx LLDPE-Ca

Debido a la mayor efectividad de la biodegradación de polietilenos de baja densidad con aditivos pro-oxidantes (LDPE-Fe y LDPE-Ca), de forma análoga se ha estudiado la biodegradación de estos materiales conteniendo estearatos de Co y Mn, aditivos que son capaces de acelerar la foto-oxidación de los materiales en 240 horas de envejecimiento fotoquímico acelerado en niveles de oxidación similares a los conseguidos en 500 horas de exposición en los materiales con estearatos de Fe y Ca.

Los resultados confirman una gran efectividad de la degradación bacteriana a 45°C en términos de formación de especies ROS procedentes del metabolismo microbiano, determinadas por análisis de emisión de QL (**Figura IV.27**), **Tabla IV.14**). Los LDPE con estearatos de Co y Mn superan en intensidad de emisión a los de LDPE-Fe aunque con inicios de la emisión (onset) en los filmes biodegradados similares y a bajas temperaturas, 40-55°C, en los dos tipos de bioensayos con *B. borstelensis* y con MIX. Al igual que ocurre con los filmes biodegradados anteriores, el metabolismo microbiano produce una reducción del índice de grupo carbonilo muy acusada (**Tabla IV.15**), aunque la pérdida de carbonilo por acción del metabolismo de las bacterias es mayor en LDPE-Co que en LDPE-Mn.

El estudio de la mineralización de los polietilenos con Co y Mn, se ha realizado tomando como referencia el LDPE-Fe y sobre los filmes tanto fotodegradados (240 horas) como termo-degradados (9 días a 70°C).

Los resultados de biodegradación obtenidos en ambos estudios y que varían en la diferente degradación previa (etapa biótica), fotoquímica (**Figura IV.28**) y térmica (**Figura IV.29**) ponen de manifiesto diferencias notables en el comportamiento de los pro-oxidantes de Fe, Co y Mn. En la biodegradación sobre los filmes fotodegradados (**Figura IV.28**), los materiales con estearato de Co tanto con *B. borstelensis* (43,6 %) como con MIX (47,6 %) llegan a valores de mineralización muy elevados, similares al de LDPE-Mn con MIX (41,1 %). Sin embargo la mineralización por *B. borstelensis* de LDPE-Mn es mucho más lenta (15,7 %), aunque también superior al tanto por ciento de mineralización de los materiales con estearato de Fe, LDPE-Fe por *B. borstelensis* (11,1 %) y *Bacillus* MIX (8,8 %).

Los resultados del estudio de biodegradación sobre los filmes termo-degradados (**Figura IV.29**) ponen de manifiesto la importante eficiencia de los estearatos de Co y Mn en la termo-degradación y la posterior mineralización, así como la nula mineralización del LDPE-Fe tratado térmicamente en las mismas condiciones (9 días a 70 °C). Al igual que en los materiales fotodegradados, la biodegradación de LDPE-Mn por *B. borstelensis* (35,4 %) es menor. La mineralización de los filmes LDPE-Co termodegradados por MIX (51,2 %) y por *B. borstelensis* (59,2 %) es muy elevada, y similar al LDPE-Mn por *Bacillus* MIX (41,5 %).

En general, los valores de mineralización alcanzados en los materiales de Co y Mn termo-degradados son superiores a los obtenidos para los filmes fotodegradados. Después de las mineralizaciones de estos materiales con Co y Mn no fue posible recuperar material, lo que confirma que se han conseguido niveles de mineralización y de fragmentación de los restos de filme muy elevados.

Algunos autores, en estudios de biodegradación en suelos de polietilenos oxidados con complejos de Co y Mn que en algunos casos no se especifican, alcanzan valores de mineralización similares, 50-60 % en 6 meses y 80 % de mineralización en compostaje (Chiellini, E. y cols. 2003). También Jakubowicz (Jakubowicz, I. 2003) ha publicado un resultado de biodegradación de polietileno termo-degradado (28 días a 70°C) en presencia de estearato de Mn, alcanzando en condiciones de compostaje, 60 % de mineralización en 180 días. Los resultados son muy variables pues también hay valores de 12 % de mineralización después de 90 días en compost (Ojeda, T. y cols. 2009).

En este Trabajo se demuestra la excelente mineralización alcanzada con los polietilenos de acolchado que contienen Co y Mn, tanto fotodegradados como termo-degradados. La biodegradación alcanzada con los polietilenos con estearatos de Co y Mn termo-oxidados podría ser de utilidad en aplicaciones de filmes para envase y embalaje que pudieran ser posteriormente compostables ya que en este proceso industrial se alcanzan temperaturas superiores a 60°C durante muchos días (Mohee, R. y cols. 2007).

Por último se ha estudiado la biodegradación de los filmes de copolímero de etileno-acetato de vinilo. Como se ha descrito anteriormente, los filmes de EVA en presencia de estearatos de Fe y Ca experimentan una efectiva degradación fotoquímica respecto al material puro, debido a la influencia de la presencia de grupos acetato en la estructura del copolímero, lo que se traduce en un aumento del proceso de desacetilación y oxidación fotoquímica. De manera análoga al estudio realizado para los materiales basados en polietileno, se analizó la biodegradación de los filmes de acolchado de EVA durante 90 días a 45°C en presencia de las diferentes bacterias utilizadas en este Trabajo.

El análisis de los espectros de FTIR muestra como la acción metabólica a 45°C de *B. borstelensis* y MIX reducen la bandas de absorción de grupo carbonilo 1735 cm⁻¹ y 1238 cm⁻¹ de grupo acetato, 1715 cm⁻¹, de grupo carbonilo cetónico y 1780 cm⁻¹ de grupo carbonilo de lactona (**Anexo I-Figura 3**),. Esta disminución de grupo carbonilo, como ya hemos comentado, sería atribuida a la preferencia en la asimilación de fragmentos de ester/carbonilo formados durante la oxidación abiótica por las bacterias (**Tabla IV.16**). Para las muestras biodegradadas la distribución de pesos moleculares se desplaza hacia la izquierda en presencia de los aditivos pro-oxidantes: ligeramente en el caso del estearato de Ca y de forma pronunciada en el estearato de Fe (**Figura IV.30**). En el caso del filme de EVA no fue posible analizarlo debido a la formación de geles y las dificultades para filtrar antes de inyectar la muestra en el GPC, hecho observado también por otros autores en EVA degradado (Copuroglu, M. y cols. 2005). El efecto de formación de gel es evidente en el caso del EVA-Ca biodegradado donde una pequeña cantidad de gel ha pasado a través del filtro, lo que contribuye al aumento del peso molecular promedio en peso, M_w. Los valores de polidispersidad son más bajos en las muestras de EVA-Fe biodegradado lo que indica que los fragmentos de bajo peso molecular se biodegradan más rápido que los fragmentos oxidados de mayor tamaño.

Estos resultados se confirman analizando los productos extraídos e identificados de los filmes fotodegradados de EVA mediante GC-MS, que fueron básicamente cadenas de hidrocarburos y alcoholes, presentándose en altas concentraciones en los materiales con aditivos pro-oxidantes frente a la baja concentración de estos presente en el EVA sin estearatos. Tras el tratamiento con bacterias a 45°C los productos de bajo peso molecular desaparecen casi por completo, hasta el nivel del EVA inicial, resultado similar al obtenido en polietileno.

El análisis del onset de emisión de QL para las muestras biodegradadas permiten el estudio de la actividad de los microorganismos a 45°C. Se observa la aparición de dos picos de emisión y el desplazamiento de las temperaturas de onset a valores inferiores que para el filme de EVA (**Figura IV.31**), confirmando la influencia de los aditivos pro-oxidantes utilizados en la degradación abiótica y posterior biodegradación de los filmes de EVA.

A través del seguimiento del proceso de biodegradación mediante medidas del CO₂ producido por las bacterias (**Figura IV.32**), se puede observar como el proceso de biodegradación de los filmes de EVA fotodegradados comienza desde el principio del ensayo, y la producción de CO₂ fue más rápida en presencia de los estearatos de Fe y Ca, al igual que se observó en polietilenos anteriormente. La biodegradación con MIX y *B. borstelensis* mostró una gran diferencia entre los materiales de EVA fotodegradados (alrededor de un 15%) y los materiales con estearatos de Fe y Ca como aditivos pro-oxidantes (23-26% de biodegradación). No se apreciaron diferencias significativas entre los ensayos realizados usando la mezcla de *Bacillus* MIX y *B. borstelensis* en los filmes fotodegradados. Solamente en el caso de *B. borstelensis* se aprecia una mayor rapidez en la mineralización de EVA-Fe fotodegradado tras 3 semanas de biodegradación aunque al final del proceso, el % de biodegradación alcanzado es similar que para la mezcla MIX.

Los porcentajes de mineralización alcanzados muestran que las cepas bacterianas utilizadas en este Trabajo son capaces de utilizar los filmes de EVA con 9 % de contenido en acetato de vinilo como única fuente de carbono. El contenido de grupos acetato en los filmes de EVA es importante en la biodegradación debido a la efectividad de los procesos de oxidación y desacetilación en comparación con el polietileno, pero en

ambos casos, la presencia de metales en forma de estearatos permite aumentar la oxidación abiótica de los materiales para permitir una segunda etapa de oxidación biótica eficiente.

En general, encontramos que los materiales sin aditivos pro-oxidantes no experimentan una oxidación muy elevada en el intervalo de tiempo estudiado, mientras que ésta si se produce en los materiales con estearatos de Fe y Ca y, en particular, en los que poseen Co y Mn en sus formulaciones, tanto en su foto-oxidación como termo-oxidación, lo que implica una mayor mineralización de los materiales tras la segunda etapa de degradación biótica (Muthukumar, T. y cols. 2010). Hay que resaltar que en este Trabajo se ha puesto de manifiesto, por primera vez, el efecto pro-degradante fotoquímico del estearato de Ca en las formulaciones de polietileno.

Los resultados indican que para una biodegradación eficiente es necesaria la selección de los microorganismos y el control de las condiciones del bioensayo. Se ha encontrado un importante efecto de la temperatura en la biodegradación de los materiales, lo que es importante desde el punto de vista de sus aplicaciones. Se observa que las cepas bacterianas utilizadas son capaces de mantenerse metabólicamente activas durante los 90 días de experimentación teniendo como única fuente de carbono los materiales fotodegradados.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1) Se han conseguido aislar cepas bacterianas adheridas a los filmes de polietileno fotodegradados después de ser expuestos en un campo de cultivo. Mediante métodos de biología molecular se han identificado bacterias Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*.

2) La adhesión bacteriana se ha producido exclusivamente en los materiales fotooxidados previamente, y se ha identificado la formación de biofilmes a través de los exopolímeros, proteínas y polisacáridos. Los biofilmes producidos por el consorcio de *Bacillus* MIX (*B. cereus*, *B. megaterium* y *B. subtilis*) son más consistentes que los de *B. borstelensis*, como confirman la mayor intensidad de las bandas de FTIR.

3) La presencia de un mayor grado de ramificación en el caso de LDPE favorece la fotodegradación respecto a LLDPE, debido a que (i) las fragmentaciones de enlaces C-H que implican a un átomo de carbono terciario están más favorecidas en LDPE, (ii) el polímero es oxidado prácticamente solo en su parte amorfa y (iii) la disminución del peso molecular en LDPE aumenta significativamente la concentración de finales de cadena (enlaces terminales e insaturaciones) que contribuyen a la degradación del polietileno.

4) La degradación fotooxidativa de los materiales estudiados se acelera por la presencia de estearatos metálicos como aditivos pro-oxidantes (concentración 0,2 %). El comportamiento del estearato de Ca como pro-degradante en polietileno ha sido descrito por primera vez. La determinación de pesos moleculares pone de manifiesto la eficiente fragmentación del polietileno cuando se incorporan los pro-oxidantes, siendo el orden de eficiencia de los estearatos $\text{Ca} < \text{Fe} < \text{Mn} \leq \text{Co}$.

En la fotodegradación acelerada de copolímeros EVA (Etileno-Acetato de Vinilo 9%), se obtiene un grado de degradación de los materiales en presencia de los estearatos de Ca y Fe similar al obtenido para los polietilenos, y favorecida por la reacción de desacetilación que experimentan los grupos polares de acetato de vinilo.

5) Solo los estearatos de Co y Mn son pro-oxidantes térmicos, induciendo una eficiente degradación en el polietileno a temperaturas superiores a 50°C. Ello permite su empleo como filme a temperatura ambiente en aplicaciones de acolchado y envase/embalaje pudiéndose graduar su vida útil variando el espesor y la concentración de aditivo pro-oxidante.

6) El estudio de biodegradación se ha llevado a cabo empleando técnicas de caracterización en los materiales biodegradados, y determinando el grado de mineralización por valoración del CO₂ generado en el metabolismo microbiano empleando *medidas indirectas de impedancia*. Todas las técnicas empleadas han demostrado su sensibilidad para evaluar la biodegradación dando resultados concordantes. El estudio de la *emisión de quimioluminiscencia* ha permitido evaluar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) procedentes del metabolismo microbiano capaces de oxidar la superficie de los polímeros. La *espectroscopía infrarroja* de los filmes de polietileno biodegradados confirma una reducción de índice de carbonilo, atribuible a la asimilación preferencial por parte de los microorganismos, de los grupos ester/carbonilo generados durante la oxidación abiótica.

7) En los estudios de degradación bacteriana de los polietilenos, se ha puesto de manifiesto que la temperatura tiene un efecto crucial en la mineralización observada en 90 días. La biodegradación a 30 °C en los materiales fotodegradados conteniendo Ca y Fe alcanza unos valores entre 0,7-1,2 % de mineralización, sin embargo, a 45 °C los valores de mineralización aumentan a 5-11 %. La biodegradación alcanzada es mayor, tanto con *B. borstelensis* como con *Bacillus* MIX, en los polietilenos fotodegradados que contienen pro-oxidantes. En general, la biodegradación es superior en el polímero con mayor grado de ramificación (LDPE), y la presencia de los grupos acetato incrementa la mineralización de los filmes de EVA-9% fotodegradados en presencia de pro-oxidantes alcanzando un 23-26% de mineralización.

8) Los resultados de biodegradación obtenidos con los polietilenos con Co y Mn ponen de manifiesto una mayor biodegradación para los materiales termo-degradados respecto a los fotodegradados. En la biodegradación sobre los filmes fotodegradados, los materiales con estearato de Co tanto con *B. borstelensis* (43,6 %) como con MIX (47,6 %) llegan a valores de mineralización elevados, similares al de LDPE-Mn con

MIX (41,1 %). Sin embargo la mineralización por *B. borstelensis* de LDPE-Mn es más lenta (15,7 %). En los previamente termo-degradados la mineralización de LDPE-Mn por *B. borstelensis* (35,4 %) es menor, y la de los filmes LDPE-Co por MIX (51,2 %) y por *B. borstelensis* (59,2 %) es muy elevada, y similar al LDPE-Mn por *Bacillus* MIX (41,5 %).

9) Los estudios de biodegradación realizados ponen de manifiesto la importancia de la selección de los microorganismos y el control de las condiciones del bioensayo. Los resultados indican que para conseguir una biodegradación de interés aplicado es necesaria una etapa previa de degradación abiótica muy eficiente, fotoquímica o térmica, que permita disminuir el peso molecular del polímero y generar fragmentos de bajo peso molecular oxidados. Por tanto, se hace totalmente necesaria la incorporación de pro-oxidantes que degraden el filme agrícola *in situ* hasta niveles que puedan ser metabolizados por los microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboulkas, A., El harfi, K., El bouadili, A., (2010) Thermal degradation behaviors of polyethylene and polypropylene. Part I: Pyrolysis kinetics and mechanisms. *Energy Conversion and Management* **51**:1363–1369.
- Abrusci, C., Martín-González, A., Del Amo, A., Corrales, T., Catalina, F., (2004a) Biodegradation of type-B gelatines by bacteria isolation from cinematographic films. A viscometric study. *Polymer Degradation Stability* **86**:283–291.
- Abrusci, C., Martín-González, A., Del Amo, A., Catalina, F., Bosch, P., Corrales, T., (2004b) Chemiluminescence study of comercial type-B gelatines. *Journal Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **163**:535-546.
- Abrusci, C., Marquina, D., Santos, A., Del Amo, A., Corrales, T., Catalina, F., (2007a). A chemiluminescence study on degradation of gelatine. Biodegradation by bacteria and fungi isolated from cinematographic films. *Journal Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **185**:188–197.
- Abrusci, C., Marquina, D., Del Amo, A., Catalina, F., (2007b) Biodegradation of cinematographic gelatin emulsion by bacteria and filamentous fungi using indirect impedance technique. *International Biodeterioration and Biodegradation* **60**:137-143.
- Abrusci, C., López-Vilanova, L., Corrales, T., Catalina, F., González, A. y López-Marín, J. (2008) Filmes agrícolas basados en Almidón. Descriptiva y mezclas. *Rev. Plást. Mod.* **629**:381-385.
- Abrusci, C., Marquina, D., Santos, A., Del Amo, A., Corrales, T., Catalina, F., (2009) Biodeterioration of cinematographic cellulose triacetate by *Sphongomonas paucimobilis* using indirect impedance and chemiluminescence techniques. *International Biodeterioration and Biodegradation* **63**:759-764.
- Abrusci, C., Pablos, J.L., Corrales, T., López-Marín, J., Marín, I., Catalina, F., (2011) Biodegradation of photodegraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives. *Int. Biodet. Biodeg.* **65**: 451-459.
- Abrusci C, Pablos JL, Marín I, Espí, E., Corrales T, Catalina F., (2012) Photodegradation and biodegradation by bacteria of mulching films based on ethylene-vinyl acetate copolymer (EVA). Effect of pro-oxidant additives. *J. Appl. Polym. Sci* Aceptado para publicación.
- Albertsson, A.C., Ramby, B., (1976) Proceeding of the Third International Biodegradation Symposium, Ed. J.M.Sharpley, A.M.Kaplan, Applied Sci. Publishers, Pag.743.
- Albertsson, A.C. (1977) Studies on the Mineralisation of ¹⁴C Labelled Polyethylenes in Aerobic Biodegradation and Aqueous Aging. Royal Institute of Technology: Stockholm, Sweden.
- Albertsson, A.C. (1978a) Biodegradation of Synthetic-Polymers 0.2. Limited Microbial Conversion of C-14 in Polyethylene to (CO₂)-C-14 by Some Soil Fungi. *J. Appl. Polym. Sci.* **22**:3419–3433.

Albertsson, A.C., Banhidi, Z. G., Beyerericsson, L.L. (1978b) Biodegradation of Synthetic-Polymers 0.3. Liberation of (CO₂)-C-14 by Molds Like Fusarium-Redolens from C-14-Labeled Pulverized High-Density Polyethylene. *J. Appl. Polym. Sci.* **22**:3435–3447.

Albertsson, A.C., Andersson, S.O., Karlsson, S., (1987) The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* **18**:73-87.

Albertsson, A.C. y Karlsson, S. (1988) The three stages in degradation of polymers-Polyethylene as a model substance. *J. Appl. Polym., Sci.* **35**:1289-1302.

Albertsson A.C., (1990b) Degradable materials: Perspectives, issues and opportunities. Eds., S.A. Barenbergs, J.L. Brash, R.Narayan, A.E. Redpath, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1990, 263-283

Albertsson A.C., Barenstedt C, Karlsson S., (1991) Susceptibility of enhanced environmentally degradable polyethylene to thermal and photo-oxidation. *Polymer Degradation and Stability* **37**:163-171.

Albertsson, A.C., Barenstedt, C., Karlsson, S., (1993a) Increased biodegradation of a low-density polyethylene (LDPE) matrix in starch-filled LDPE materials. *Journal of Environmental Polymer Degradation* **1**:241-245.

Albertsson A.C., Karlsson S., (1993b) Environment-adaptable polymers. *Polymer Degradation and Stability* **41**:345-349.

Albertsson A.C., Barenstedt C, Karlsson S., (1994) Abiotic degradation products from enhanced environmentally degradable polyethylene. *Acta Polym* **45**:97-103.

Albertsson, A.C., Barenstedt, C., Karlsson, S., Lindberg, T. (1995) Degradation products pattern and morphology changes as means to differentiate abiotically and biotically aged degraded polyethylene. *Polymer*, **36**:3075-3083

Albertsson, A.C., Erlandsson, B., Hakkarainen, M., Karlsson, S. (1998) Molecular Weight Changes and Polymeric Matrix Changes Correlated with the Formation of Degradation Products in Biodegraded Polyethylene. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, **Vol. 6**, No. 4.

Allen, N.S., Edge, M., (1992) *Fundamentals of polymer degradation and stabilisation*, Oxford: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

Allen NS, Edge M, Rodriguez M, Liauw CM, Fontan E., (2000) Aspects of the thermal oxidation of ethylene vinyl acetate copolymer. *Polym. Deg. Stabil.* **68**:363-371.

Al-Madga, H., Mohamed, Z., Kassem, M.E., (1998) Weather ageing characterization of the mechanical properties of the low density polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* **62**:105-109.

Andrady, A.L., (2011) Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* **62**:1596–1605.

- Arnaud, R., Moisan, J., Lemaire, J., (1984) Primary hydroperoxidation in low-density polyethylene *Macromolecules* **17**:332-336.
- Ayutthaya S.I.N., Wootthikanokkhan J., (2008) Investigation of the photodegradation behaviours of an ethylene/vinyl acetate copolymer solar cell encapsulant and effects of antioxidants on the photostability of the material. *J. Appl. Polym. Sci.* **107**:3853-3863.
- Baloch, M.K., Khurram, M.J.Z., Durrani, G.F., (2011) Application of Different Methods for the Thermogravimetric Analysis of Polyethylene Samples. *Journal of Applied Polymer Science.* **120**:3511–3518.
- Bassett, D. C., (1981) *Principles of Polymer Morphology*. Cambridge Univ. Press, London
- Benavides R, González-Hernández R, González-Cantú M.C., Reyes-Vielma B, Billingham N.C., (2003) Accelerated degradation of highly loaded polypropylene. *J.Vinyl Addit. Techn.* **9**:41-49.
- Blanco, I., Abate, L., Antonelli, M.L., (2011) The regression of isothermal thermogravimetric data to evaluate degradation E_a values of polymers: A comparison with literature methods and an evaluation of lifetime prediction reliability. *Polymer Degradation and Stability* **96**:1947-1954.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.M., Lemaire, J., Sancelme, M., Scott, G., (2003) Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* **81**:441-452.
- Borghei, M., Karbassi, A., khoramnejadian, S., Oromiehie, A., Javid, A.H., (2010) Microbial biodegradable potato starch based low density polyethylene. *African Journal of Biotechnology* **9**:4075-4080.
- Boyer, R.F. (1973) Glass temperatures of polyethylene. *Macromolecules* **6**:288-299.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R., (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:11621-11626.
- Briassoulis, D. (2004). An overview on the mechanical behavior of biodegradable agricultural films. *Journal of polymers and the environment* **12**:65-80.
- Brogly M, Nardin M, Schultz J., (1997) Effect of vinylacetate content on crystallinity and second-order transitions in ethylene-vinylacetate copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **64**:1903-1912.
- Broska R, Rychly J., (2001) Double stage oxidation of polyethylene as measured by chemiluminescence. *Polym Deg Stab.* **72**:271-278.
- Catalina F, Peinado C, Allen NS, Corrales T., (2002a) Chemiluminescence of polyethylene: The comparative antioxidant effectiveness of phenolic stabilizers in low-density polyethylene. *J Polym Sci Part A. Polym Chem.* **40**:3312.

- Catalina, F., Salmerón, A., García, Y., Espí, E. (2002b) Aditivos fotoestabilizantes para filmes agrícolas. Interacción con pesticidas. Rev. Plást. Mod. **547**:57-66.
- Catalina, F., (2004a) Degradación y Estabilización de Polímeros, Vol. I, **Cap. 7**:389-414, Ciencia y Tecnología de Polímeros, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros – CSIC.
- Catalina, F., González-Juárez, F., Corrales, T., Marquina, D., Abrusci, C. (2004b) Ensayos de biodegradación microbiológica de materiales plásticos en filmes para acolchado agrícola. Rev. Plást. Mod. **575**:427-435
- Catalina, F., Corrales, T. y Abrusci, C. (2005) Biodegradación de Polímeros en el Medioambiente. Biotecnología medioambiental. **Cap.14**:231-247.
- Catalina, F., López-Vilanova, L., Marquina, D. y Abrusci, C. (2006) Biodegradación de polímeros en tierras de cultivo. Factores abióticos y bióticos de la degradación. Revista Plást. Mod. **603**:256-262.
- Celina M., George G.A., (1993) A heterogeneous model for the thermal oxidation of solid polypropylene from chemiluminescence analysis. *Polym. Deg. Stab.*, **40**:323-335.
- Celina M., George G.A., Billingham N.C., (1996) Polymer Durability: Degradation, Stabilization and Lifetime prediction. *Advances in Chemistry Series 249*, American Chemical Society, Washington, DC. **Cap. 11**, 159.
- Chen S., Zhang J., Su J., (2009) Effect of hot air aging on the properties of ethylene-vinyl acetate copolymer and ethylene-acrylic acid copolymer blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **112**:1166-1174.
- Chiellini, E. y Solaro, R. (2002) Biodegradable polymers and plastics. **Cap 1**, 24.
- Chiellini, E., Corti, A., Swift, G., (2003) Biodegradation of thermally-oxidized, fragmented low-density polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability* **81**:341-351.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., (1986) The genus *Bacillus*. In: Sneath, P.H.A., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, **2**:1105–1139.
- Colin, G., Gooney, J.D., Wiles, D., (1976) Some factors influencing the microbial degradation of polyethylene. *Internacional Biodeterioration Bulletin* **12**:67
- Contat-Rodrigo, L., Haider, N., Ribes-Greus, A., Karlsson, S., (2001) Ultrasonication and microwave extraction of degradation products from degradable polyolefin blends aged in soil. *Journal of Polymer Science* **79**:1101-1112.
- Copuroglu M, Sen M., (2005) A comparative study of UV aging characteristics of poly(ethylene-co-vinyl acetate) and poly(ethylene-co-vinyl acetate)/carbon black mixture. *Polym. Adv. Technol.* **16**:61-66.

- Corrales T, Catalina F, Peinado C, Allen NS, Montan E., (2002) Photooxidative and thermal degradation of polyethylenes: interrelationship by chemiluminescence, thermal gravimetric analysis and FTIR data. *J Photochem Photobiol. A: Chem.* **147**:213-224.
- Corrales T, Peinado C, Allen NS, Edge M, Sandoval G, Catalina F., (2003) A chemiluminescence study of micron and nanoparticle titanium dioxide: effect on the thermal stability of metallocene polyethylene. *J Photochem Photobiol A:Chem.* **156**:151-60.
- Corrales T, Escudero M, Quijda I, Catalina F, Abrusci C., (2009) A chemiluminescence study on thermal and photostability of ethylene/ α -olefin copolymers synthesized with rac-Et(Ind)₂ZrCl₂/MAO catalyst system. *Polym Deg Stab.* **45**:2708-16
- Corti, A., Muniyasamy, S., Vitali, M., Imam, S.H., Chiellini, E., (2010) Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polymer Degradation and Stability* **95**:1106-1114.
- Dai, H., Chang, P.R., Geng, F., Yu, J., Ma, X. (2010) Preparation and properties of starch-based film using N,N-bis(2-hydroxyethyl)formamide as a new plasticizer. *Carbohydrate Polymers* **79**:306–31.
- David, C., Trojan, M., Daro, A., (1992) Photodegradation of polyethylene: comparison of various photoinitiators in natural weathering conditions. *Polymer Degradation and Stability* **37**:233-245.
- Díaz, T., Espí, E., Fontecha, A., Jiménez, J.C., López, J., Salmerón, A., (2001) Los filmes plásticos en la producción agrícola. Ed. Repsol YPF – Mundi-Prensa.
- Dobkowski, Z., (2006) Thermal analysis techniques for characterization of polymer materials. *Polymer Degradation and Stability* **91**:488-493.
- Dudler V, Lacey DJ, Kröhnke C., (1996) Chemiluminescence from polypropylene. Part 3: Application to the study of antioxidant effectiveness. *Polym Deg Stab.* **51**:115-24.
- Espí E, Fontecha A, García-Alonso Y, Marín A, Salmerón A., (2004) Advantages of EVA copolymers in film cover for greenhouses. *Plasticulture* **123**:72-85
- Eubeler, J.P., Bernhard, M., Knepper, T.P., (2010) Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *Trends in Analytical Chemistry*, **29**:84-100.
- Fanton, E., Tidjani, A., Arnaud, R., (1994) Hydroperoxidation in the low-temperature thermooxidation of linear low density polyethylene. *Polymer* **35**:433-434
- Fatou. J.G. (1985) Polietileno y copolímeros. *Revista de Plásticos Modernos* 1985 **2**:3-9.
- Fechine GJM, Demarquette NR., (2008) Cracking formation on the surface of extruded photodegraded polypropylene plates. *Polym. Eng. Sci.* **8**:365-372.

- Fechine GJM, Rosa DS, Rezend ME, Demarquette NR., (2009) Effect of UV radiation and pro-oxidant on PP biodegradability. *Polym. Eng. Sci.* **9**:123-128.
- Flory, P.J., Vrij A., (1963) Melting Points of Linear-Chain Homologs. Melting points of linear-chain homologs. *The Normal Paraffin Hydrocarbons. J. Am. Chem. Soc.* **85**: 3548-3553.
- Fontanella, S., Bonhomme, S., Koutny, M., Husarova, L., Brusson, J.M., Courdavault, J.P., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G., Lemaire, J., Delort, A.M., (2010) Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polym. Deg. Stabil.* **95**:1011-1021.
- Grant, M. H., 1991, *Encyclopedia of Chemical Technology*; Wiley: New York, **Vol. 8**:433.
- George, G.A., (1981) *Developments in Polymer Degradation-3*. Applied Science Publishers. London Pag.173.
- Gibson, T., Gordon, R. E., (1974) *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 529-555
- Greene, J., (2007) Biodegradation of Compostable Plastics in Green Yard-Waste Compost Environment. *J Polym Environ* **15**:269–273.
- Gu, J.D., (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **52**: 69-91.
- Gugumus, F., (1995) Re-examination of the role of hydroperoxides in polyethylene and polypropylene: chemical and physical aspects of hydroperoxides in polyethylene *Polym. Degrad. Stab.* **49**:29-50
- Gulmine, J.V., Janissek, P.R., Heise, H.M., Akcelrud, L., 2003. Degradation profile of polyethylene after artificial accelerated weathering. *Polymer Degradation and Stability* **79**:385-397.
- Hadad, D., Geresh, S., Sivan, A., (2005) Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*, *Journal of Applied Microbiology* **98**:1093-1100.
- Haines, J.R., Alexander, M. (1974) Microbial degradation of high molecular weight alkanes. *Appl. Microbiol.* **28**:1084-1085.
- Hakkarainen, M. y Albertsson, A.C. (2004) Environmental degradation of polyethylene. *Adv. Polym. Sci.*, **169**:177-184.
- Haken J.K., Werner R.I., (1971) Infra-Red Spectra of Polyvinyl Acetate and Poly- $\alpha,\alpha',\beta/3$ -Trideuterovinyl Acetate. *Brit. Polym. J.* **3**:157-162.
- Hamon, M.A., Lazazzera, B.A. (2001) The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **42**:1199-1209.

- Haslam, J., Willis, H.A., Squirrell, D.C.M., (1972) Identification and analysis of plastics, 2nd Ed. Butterworth, London, Pag.178.
- Hinsken, H., Moss, S., Pauquet, J.R., Zweifel, H., (1991) Degradation of polyolefins during melt processing. *Polym. Degrad. Stab.* **34**:279-293.
- Hori, K., Matsumoto, S., (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* **48**:424-434.
- Jakubowicz, I., (2003) Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE). *Polymer Degradation and Stability* **80**:39-43.
- Jakubowicz, I., Yarahmadi, N., Petersen, H., (2006) Evaluation of the rate of abiotic degradation of biodegradable polyethylene in various environments. *Polymer Degradation and Stability* **91**:1556-1562.
- Jakubowicz, I., Yarahmadi, N., Arthurson, V., (2011) Kinetics of abiotic and biotic degradability of low-density polyethylene containing prodegradant additives and its effect on the growth of microbial communities. *Polymer Degradation and Stability* **96**:919-928.
- Jayasekara, R., Hardin, I., Bowater, I., Lonergan, G., (2005) Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*, **13**:231-251.
- Jen-Hao, L., Schwartz, A., (1961) *Kunststoffe*, **51**:317.
- Jin J, Chen S, Zhang J., (2010a) UV aging behaviour of ethylene-vinyl acetate copolymers (EVA) with different vinyl acetate contents. *Polym. Deg. Stabil.* **95**:25-732.
- Jin J, Chen S, Zhang J., (2010b) Investigation of UV aging influences on the crystallization of ethylene-vinyl acetate copolymer via successive self-nucleation and annealing treatment. *J Polym Res.* **17**:827-836.
- Jirackova-Audouin L, Verdu J., (1987) Chemiluminescence of hydrocarbon polymers *J Polym Sci Part A Polym Chem.* **25**:1205-1210.
- Jones, P.H., Prasad, D., Heskins, M., Morgan, M.H., Guillet, J.E., (1974) Biodegradability of photodegraded polymers: I. Development of experimental procedures. *Environ.Sci.Technol.*, **8**:919-923
- Kamal, M.R., (1970) Cause and effect in the weathering of plastics *Polym. Eng. Sci.* **110**:108-121.
- Kapich, A. N., Jensen, K. A. y Hammel, K. E., (1999) Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. *FEBS Lett.* **461**:115-119.

- Kapri, A., Zaidi, M.G.H., Satlewal, A., Goel R., (2010) SPION-accelerated biodegradation of low-density polyethylene by indigenous microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* **64**:238-244.
- Kawai, F., Watanabe, M., Shibata, M., Yokoyama, S., Sudate, Y., Hayashi, S., (2004) Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi. *Polymer Degradation and Stability* **86**:105-114.
- Khabbaz, F., Albertsson, A-C, Karlsson, S., (1998) Trapping of volatile low molecular weight photoproducts in inert and enhanced degradable LDPE. *Polymer Degradation and Stability* **61**:329-342.
- Khabbaz, F., Albertsson, A-C, Karlsson, S., (1999) Chemical and morphological changes of environmentally degradable polyethylene films exposed to thermo-oxidation. *Polymer Degradation and Stability* **63**:127-138.
- Khabbaz, F., Albertsson, A.C., (2001) Rapid test methods for analyzing degradable polyolefins with a pro-oxidant system. *Journal of applied polymer science* **79**:2309-2316.
- Klemme, D.E., Watkins, G.M., (1950) Polyethylenes and Related Substances; Resistance of to the Growth of Fungi (Project P-JO) (U. S. Naval Ordnance Lab., Silver Spring, Md., Memorandum 10726, 1950)
- Konduri, M.K.R, Koteswarareddy, G. Rohini Kumar, D.B., Reddy, B.V., Narasu, M.L., (2011) Effect of Pro-Oxidants on Biodegradation of Polyethylene (LDPE) by Indigenous Fungal Isolate, *Aspergillus oryzae*. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. **120**:3536–3545.
- Koutny, M., Lemaire, J. y Delort, A. M. (2006) Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere*, **64**:1243-1252.
- Koutny M, Vaclavkova T, Matisova-Rychla L, Rychly J., (2008) Characterization of oxidation progress by chemiluminescence: A study of polyethylene with pro-oxidant additives. *Polym Deg Stab.* **93**:1515-19.
- Kron A, Stenberg B, Reitberg T, Billingham NC., (1996) Chemiluminescence from oxidation of polypropylene: Correlation with peroxide concentration. *Polym Deg Stab.* **53**:119-27.
- Kyrikou, I. y Briassoulis. D. (2007) Biodegradation of agricultural plastics films: A critical review. *J. Polym. Environ.* **15**:125-150.
- Lacey, D.J., Dudler, V., (1996) Chemiluminescence from polypropylene. Part 2: The emission wavelengths during prolonged oxidation. *Polym. Deg. Stab.*, **51**:101-113.
- Lacosta, J.M., (1991) El envejecimiento ambiental de los materiales poliméricos. Características para su evaluación y métodos de ensayo (I parte). *Rev. Plást. Mod.* **415**:125-129

- Linos, A., Berekaa, M.M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H.C., Kroppenstedt, R.M., Steinbuchel, A., (2000) Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by distinct *actinomycetes*: Microbial strategies and detailed surface analysis. *Applied Environmental Microbiology* **66**:1639-1645.
- Liu, M., Horrocks, A.R., Hall, M.E., (1995) Correlation of physicochemical changes in UV exposed low density polyethylene films containing various UV stabilizers. *Polym. Deg. Stabil.* **49**:151-161.
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., (2008) Polymer biodegradation: Mechanisms and stimulation techniques. *Chemosphere* **73**:429-442.
- Luo, X., Zhang, Z., Liang, Z., (1994) Structure of Cobalt Stearate and Cobalt Sulfide-Stearic Acid Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir* **10**:3213-3216
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endtz, H., Naumann, D., Puppels, G.J., (2002) Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **51**:255-271.
- Matsumura S., Tanaka, T., (1994) Novel malonate-type copolymers containing vinyl alcohol blocks as biodegradable segments and their builder performance in detergent formulations. *J. Environ. Polym. Degrad.*, **2**:89-97.
- Mohee, R., Unmar, G., (2007) Determining biodegradability of plastic materials under controlled and natural composting environments. *Waste Management* **27**:1486–1493.
- Morpeth, F. (1985) Some properties of cellobiose oxidase from White-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biochem. J.* **15**:557-564.
- Morlat-Therias, S., Fanton, E., Gardette, J.L., Peeterbroeck, S., Alexandre, M., Dubois, P., (2007) Polymer/carbon nanotube nanocomposites: influence of carbon nanotubes on EVA photodegradation. *Polym. Deg. Stabil.* **92**:1873-1882.
- Moreno, J., Marín, I., Sanz, J.L. y Amils, R., (2005) Compostaje. *Biotechnología y medioambiente*. Ed. Ephemera. **Cap. 11**.
- Murray, P.R., Barron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Yolken, R.H., (1995) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC:American Society of Microbiology.
- Muthukumar, T., Aravinthan, A., Mukesh, D., (2010) Effect of environment on the degradation of starch and pro-oxidant blended polyolefins. *Polymer Degradation and Stability* **95**:1988-1993.
- Nostro, A., Scaffaro, R., Ginestra, G., D'arrigo, M., Botta, L., Marino, A., Bisignano, G., (2010) Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:729–737.

- Ojeda T.F.M., Dalmolin, E., Forte, M.M.C., Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Camargo, F.A.O., (2009) Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. *Polym Deg Stab.* **94**:965-70.
- Ohtake, Y., Kobayashi, T., Ashabe, H., Murakami, N., Ono, K., (1995) Biodegradation of low density polyethylene, polystyrene, polyvinyl-chloride, and urea-formaldehyde resin buried in soil for over 32 years. *Journal of Applied Polymer Science* **56**:1789-1796.
- Ohtake, Y., Kobayashi, T., Asabe, H. y Murakami, N., (1998) Studies on biodegradation of LDPE-observation of LDPE films scattered in agricultural fields or in garden soil. *Polym. Deg. Stabil.*, **60**:79-84.
- Orr, I. G., Hadar, Y. y Sivan, A. (2004) Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biot.*, **65**:97-104.
- Osawa, Z., Shibamiya, T., Matsuzaki, K. (1968). *Kogyo Kagaku Zasshi* **71**:552
- Osawa, Z., Kuriso, N., Nagashima, K., Nakano, K., (1979) The Effect of Transition Metal Stearates on the Photodegradation of Polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science* **23**:3583-3590.
- Owens, J.D., Thomas, D.S., Thompson, P.S., Timmerman, J.W., (1989) Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations. *Appl. Microbiol. Lett.* **9**:245-249.
- Pablos, J.L., Abrusci, C., Marín, I. , López-Marín, J., Catalina, F., Espí, E., Corrales, T., (2010) Photodegradation of polyethylenes: comparative effect of Fe and Ca stearates as pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability* **95**:2057-2064.
- Park, J.W., Oh, S.C., Lee, H.P., Kim, H.T., Yoo, K.O., (2000) A Kinetic analysis of thermal degradation of polymers using a dynamic method. *Degradation and Stability* **67**:535-540.
- Peacock, A.J., (2000) Handbook of polyethylene. Structure, properties and applications. Marcel Dekker, New York. 181-182.
- Peinado, C., Allen, N.S., Salvador, E.F., Corrales, T., Catalina, F., (2002) Chemiluminescence and fluorescence for monitoring the photooxidation of an UV-cured aliphatic polyurethane-acrylate based adhesive. *Polym Deg Stab.* **77**:523-29.
- Peinado, C., Corrales, T., García-Casas, M.J., Catalina, F., Ruiz Santa Quiteria, V., Parellada, M.D., (2006) Chemiluminescence from poly(styrene-*b*-ethylene-*co*-butylene-*b*-styrene) (SEBS) block copolymers. *Polym Deg Stab.* **91**:862-74.
- Phadke, D.S., Sack, M.J. (1996) Evaluation of Batch-to-Batch and Manufacturer-to-Manufacturer Variability in the Physical and Lubricant Properties of Calcium Stearate. *Pharmaceutical Technology* **20**:126-140

- Pierce, E., Carmona, F.J, Amirfazli, A., (2008) Understanding of sliding and contact angle result in tilted plate experiments. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **323**:73–82.
- Potts, J.E., Clendinning, R.A., Ackart, W.B., (1972) An investigation of the biodegradability of packaging plastics. National Technical Information Service (U.S. Dept. of Commerce) Report PB 213 488.
- Raquez, J.M., Bourgeois, A., Jacobs, H., Degeé, P., Alexandre, M., Dubois, P., (2011) Oxidative Degradations of Oxodegradable LDPE Enhanced with Thermoplastic Pea Starch: Thermo-Mechanical Properties, Morphology, and UV-Ageing Studies. *Journal of Applied Polymer Science*. **122**:489–496.
- Reddy, M.M. Gupta, R.K., Bhattacharya, S.N., Parthasarathy, R., (2008) Abiotic oxidation studies of oxo-biodegradable polyethylene. *Journal of Polymers and the Environment* **16**:27-34.
- Reddy, M.M., Deighton, M., Gupta, R.K., Bhattacharya, S.N., Parthasarathy, R., (2009) Biodegradation of oxo-biodegradable polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science* **111**:1426–1432.
- Rodriguez-Vazquez M, Liauw CM, Allen NS, Edge M, Fontan E., (2006) Degradation and stabilisation of poly(ethylene-stat-vinyl acetate): 1-Spectroscopic and rheological examination of thermal and thermo-oxidative degradation mechanisms. *Polym. Deg. Stabil.* **91**:154-164.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., Chaterjee, S.N., Choudhary, V., (2005) Effect of benzil and cobalt stearate on the aging of low-density polyethylene films. *Polymer Degradation and Stability* **90**:577-585.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., Choudhary, V., (2006a) Effect of cobalt carboxylates on the photo-oxidative degradation of low-density polyethylene. Part-I. *Polym Deg Stab.* **91**:1980-1988.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., Chaterjee, S.N., Choudhary, V., (2006b) Accelerated aging of LDPE films containing cobalt complexes as prooxidants. *Polymer Degradation and Stability* **91**:1791-1799.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., Choudhary, V., (2007a). Thermal degradation studies of LDPE containing cobalt stearates as pro-oxidant. *eXPRESS Polymer Letters* **1**:208-216.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., Chaterjee, S.N., Choudhary, V., (2007b). Studies on the photo-oxidative degradation of LDPE films in the presence of oxidized polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* **92**:1151-1160.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., Choudhary, V., (2007c) Comparative Effects of Cobalt Carboxylates on the Thermo-Oxidative Degradation of LDPE Films. *Journal of Applied Polymer Science*. **103**:3758–3765

- Roy, P.K., Titus, S., Surekha, P., Tulsi, E., Deshmukh, C., Rajagopal, C., (2008a) Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability* **93**:1917-1922.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., Choudhary, V., (2008b) Degradation Behavior of Linear Low-Density Polyethylene Films Containing Prooxidants Under Accelerated Test Conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, **108**:2726–2733.
- Roy, P.K., Surekha, P., Raman, R., Rajagopal, C., (2009). Investigation the role of metal oxidation state on the degradation behavior of LDPE. *Polymer Degradation and Stability* **94**:1033-1039.
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C., (2011a) Surface Oxidation of Low-Density Polyethylene Films to Improve Their Susceptibility Toward Environmental Degradation. *Journal of Applied Polymer Science*. **122**:2765–2773
- Roy, P.K., Hakkarainen, M., Varma, I.K., Albertsson, A.C., (2011b) Degradable Polyethylene: Fantasy or Reality. *Environ. Sci. Technol.* **45**:4217–4227.
- Ruiz-Dueña, F. J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J. y Martínez, A. T. (2001) A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc.* **29**:116-122.
- Rychlý, J., Matisová-Rychlá, L., Csomorová, K., Janigová, I., Schilling, M., Learner, T., (2011) Non-isothermal thermogravimetry, differential scanning calorimetry and chemiluminescence in degradation of polyethylene, polypropylene, polystyrene and poly(methyl methacrylate). *Polymer Degradation and Stability* **96**:1573-1581.
- Scott, G., Wiles, D.M., (2001) Programmed-Life Plastics from Polyolefins: A New Look at Sustainability. *Biomacromolecules*. **2**:615-22.
- Schultz, J. M., (2001) *Polymer Crystallization. The Development of Crystalline Order in Thermoplastic Polymers*, Oxford Univ. Press, Am. Chem. Soc., Washington D. C.
- Shen, J. y Bartha, R. (1996) Priming effect of substrate addition in soil-based biodegradation test. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1428-1430.
- Singh, B., Sharma, N., (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability* **93**:561-584.
- Song, Y., Yang, J., Pan, H., Li, J., Zhu, J., Deng, X., Khizhnyak, S.V., Gurevich, Y.L., (2012). Isolation and identification of a low density polyethylene degradable bacterium. *Advanced Materials Research* **356-360**:172-177.
- Spencer, L.R., Hiskins, M., Guillet, J.E., (1976) *Proceeding of the Third International Biodegradation Symposium*, Ed. J.M.Sharpley, A.M.Kaplan, Applied Sci. Publishers. Pag.753.

- Sudhakar, M., Doblea, M., Murthyb, P.S., Venkatesan, R., (2008) Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **61**:203–213
- Taiwo, A.M., (2011) Composting as a sustainable waste management technique in developing countries. *Journal of environmental science and technology* **4**:93-102.
- Tanaka, H., Itakura, S. y Enoki, A., (1999) Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*., *J. Biotechnol.* **75**:57-70.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research* **25**:4876–4882.
- Volke-Sepulveda, T., Sucedo-Castaned, G., Gutierrez-Rojas, M., Manzur, A. y Favela-torres, E., (2002) Termally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilium* and *Aspergillus niger*. *J. Appl. Polym. Sci.* **83**:305-314.
- Warth, A.D., (1978) Relationship Between the Heat Resistance of Spores and the Optimum and Maximum Growth Temperatures of *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology* **134**:699-705.
- Watanabe, T., Ohtake, Y., Asabe, H., Murakami, N. y Furukawa, M., (2009) Biodegradability and Degrading Microbes of Low-Density Polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science* **111**:551-559.
- Weon, J.I., (2010) Effects of thermal ageing on mechanical and thermal behaviors of linear low density polyethylene pipe. *Polymer Degradation and Stability* **95**:14-20.
- Wiles, D. M., (1973) The effect of light on some commercially important polymers *Polymer Sci. Engineering*, **13**:74-77.
- Wunderlich, B., (1973-1976) *Macromolecular Physics*. Academic Press, New York, Vol. 1 y 2.
- Xu, L.C., Siedlecki, Ch.A., (2007) Effect of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* **28**:3273-3283.
- Yakabe Y., Kitano, M. (1994) *Biodegradable plastics and polymers*. Eds. Y.Di, K.Fukuda, Elsevier Science, New York, Pag. 331.
- Youssef, B., Dehbi, A.E., Hamou , A., Saiter, J.M., (2008) Natural ageing of tri-layer polyethylene film: Evolution of properties and lifetime in North Africa region. *Materials and Design* **29**:2017–2022.
- Zahra, S., Abbas, S.S., Mahsa, M.T., Mohsen, N., (2010) Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste Management* **30**:396–401.
- Zhao W, Zhong X, Yu L, Zhang Y, Sun J., (1994) Determination of the vinyl acetate content in ethylene-vinyl acetate copolymers by thermogravimetric analysis. *Polym.* **35**:3348-3350.

Zlatkevich, L., (1985) Chemiluminescence study of polymer oxidative stability. Journal of Polym. Sci. Part B. Polym. Phys. **23**:1691-1698.

ANEXOS

ANEXO I

ANEXO I. DATOS ADICIONALES (Tablas y Gráficas).

Degradación fotoquímica de filmes de polietileno con estearatos de Ca, Fe, Co y Mn.

Tabla 1: Datos de onset de emisión de QL para materiales fotodegradados de forma acelerada.

Análisis de QL	Inicial		Fotodegradado	
	T (°C) Onset	T _{max} (°C)	T (°C) Onset	T _{max} (°C)
LDPE	180 °C	-	106 °C	-
LDPE Fe	165 °C	-	88 °C	101 °C
LDPE-Ca	95 °C	-	87 °C	129 °C
LDPE Co	199 °C	-	61 °C	147 °C
LDPE Mn	168 °C	-	60 °C	157 °C

Tabla 2: Valores de cristalinidad (% X_c) y temperaturas de fusión (T_m) de filmes iniciales y fotodegradados.

Análisis de DSC	Inicial		Fotodegradado	
	% X _c	T _m (°C)	% X _c	T _m (°C)
LDPE	25	107	27	112
LDPE-Fe	23	112	26	113
LDPE-Co	27	112	32	111
LDPE-Mn	23	113	20	111

Degradación termo-oxidativa de filmes de polietileno con estearatos de Fe, Co y Mn.

Tabla 3: Valores de cristalinidad (% X_c) de filmes iniciales y degradados térmicamente a las diferentes temperaturas.

Análisis de DSC	Inicial	90°C	70°C	60°C	55°C	45°C
	X_c (%)	X_c (%)	X_c (%)	X_c (%)	X_c (%)	X_c (%)
LDPE	24,9	24,8	24,9	24,9	24,9	24,2
LDPE-Fe	23	23	23,2	23,2	23,2	23
LDPE-Co	27,2	24,2	33,4	31,6	30,1	27,5
LDPE-Mn	23,1	24,7	27,6	24,9	23	21,6

Degradación fotoquímica de copolímeros etileno-acetato de vinilo (EVA) con estearatos de Fe y Ca.

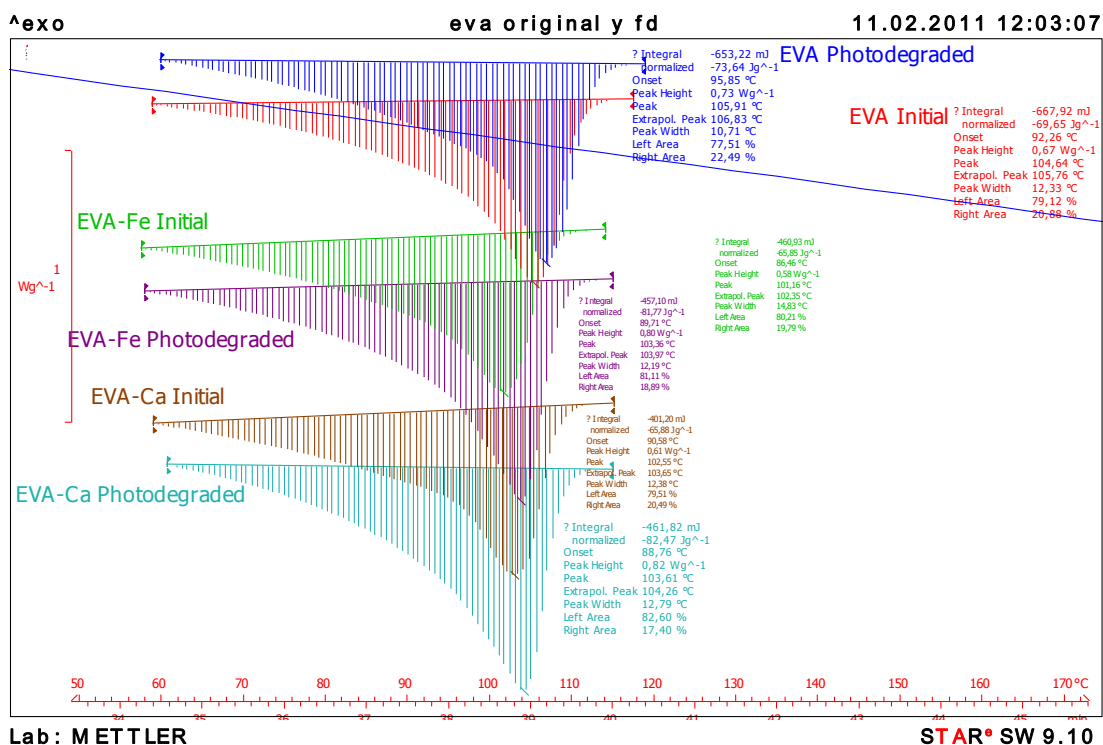


Figura 1: Endoterma de fusión (DSC) de materiales EVA iniciales y fotodegradados.

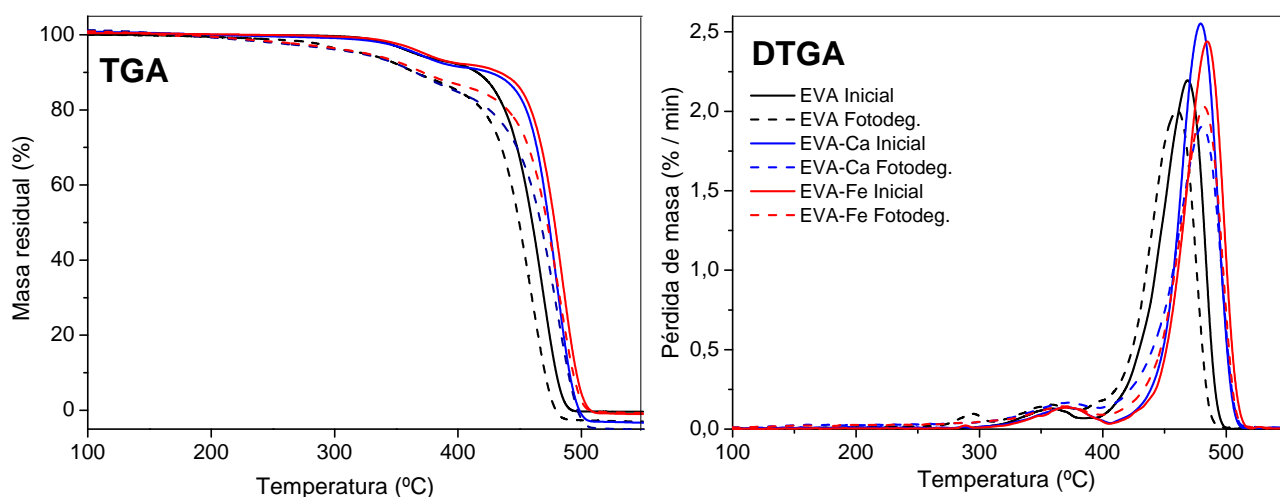


Figura 2: TGA y DTGA de filmes de EVA, EVA-Ca y EVA-Fe, iniciales y tras 432 horas de fotodegradación.

Tabla 4: Valores de índice de grupo carbonilo de filmes de EVA iniciales y fotodegradados

Análisis de FTIR	A_{1735}/A_{2850}	A_{1715} / A_{2850}	A_{1238} / A_{2850}	A_{1175} / A_{2850}	A_{1780} / A_{2850}
EVA	<i>0,30</i>	<i>0,03</i>	<i>0,35</i>	<i>0,03</i>	<i>0,01</i>
EVA Fotodeg.	<i>0,28</i>	<i>0,10</i>	<i>0,33</i>	<i>0,08</i>	<i>0,02</i>
EVA-Ca	<i>0,53</i>	<i>0,06</i>	<i>0,61</i>	<i>0,06</i>	<i>0,01</i>
EVA-Ca Fotodeg.	<i>0,44</i>	<i>0,28</i>	<i>0,53</i>	<i>0,14</i>	<i>0,07</i>
EVA-Fe	<i>0,53</i>	<i>0,07</i>	<i>0,60</i>	<i>0,06</i>	<i>0,01</i>
EVA-Fe Fotodeg.	<i>0,44</i>	<i>0,25</i>	<i>0,46</i>	<i>0,17</i>	<i>0,04</i>

1735 cm^{-1} : banda de tensión de grupo carbonilo de ester alifático

1715 cm^{-1} : banda de tensión de grupo carbonilo cetónico

1780 cm^{-1} : banda de tensión de carbonilo de lactona

1238 cm^{-1} : banda de flexión de C-O de acetatos

1173 cm^{-1} : banda de flexión C-O de ésteres metílicos de ácido.

Biodegradación por microorganismos de filmes de polietileno altamente degradados.

Tabla 5: Datos de Temperatura de onset e Intensidad máxima de emisión de QL, para las muestras fotodegradadas y biodegradadas a 30 y 45 °C por *B. borstelensis* y MIX.

	Fotodeg.	<i>B. borstelensis</i> / 45°C			<i>B. borstelensis</i> / 30°C	
	T (°C) Onset	T (°C) Onset	I _{max} (mV) T _{max-1} (°C)	I _{max} (mV) T _{max-2} (°C)	T (°C) Onset	I _{max} (mV) T _{max} (°C)
LDPE	106	90	-	-	106	-
LDPE-Ca	123	37	49 (77°C)*	-	71	186 (185°C)
LDPE-Fe	101	40	656 (120°C)	-	60	-
LLDPE	196	92	-	-	135	-
LLDPE-Ca	209	40	50 (77°C)	87 (162°C)	115	-
LLDPE-Fe	110	35	56 (76°C)	163 (156°C)	103	29 (165°C)

	MIX / 45°C			MIX / 30°C	
	T (°C) Onset	I _{max} (mV) T _{max-1} (°C)	I _{max} (mV) T _{max-2} (°C)	T (°C) Onset	I _{max} (mV) T _{max} (°C)
LDPE	90	-	-	106	-
LDPE-Ca	38	145 (100°C)	101 (160°C)	75	205 (158°C)
LDPE-Fe	38	89 (95°C)	33 (160°C)	89	61 (158°C)
LLDPE	96	-	-	102	-
LLDPE-Ca	53	-	150 (164°C)	105	114 (175°C)
LLDPE-Fe	45	73 (100°C)	164 (152°C)	86	-

Biodegradación por microorganismos de copolímeros de EVA con estearatos de Fe y Ca.

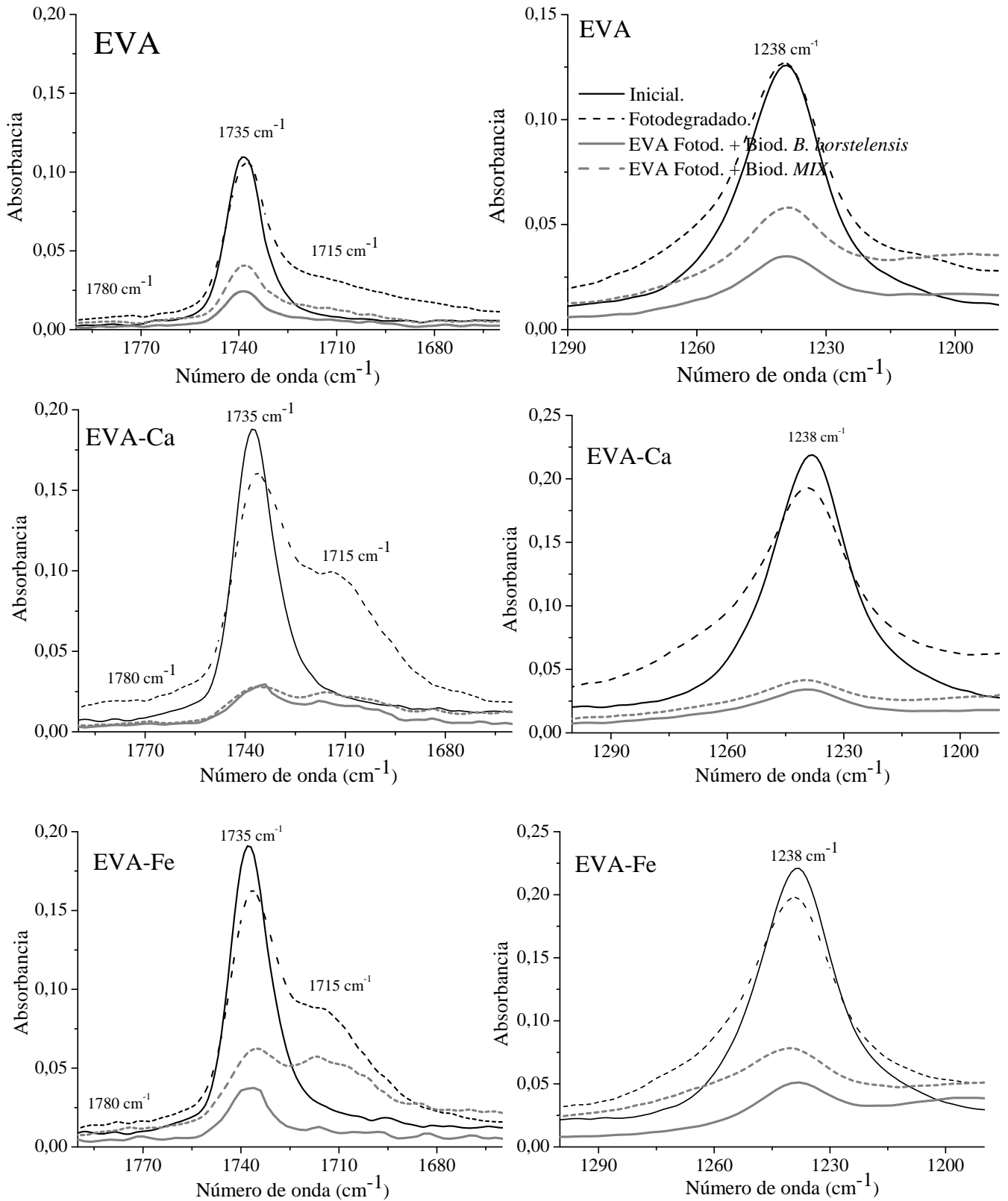


Figura 3: FTIR de filmes de EVA iniciais, fotodegradados y biodegradados por *MIX* y *B. borstelensis*.

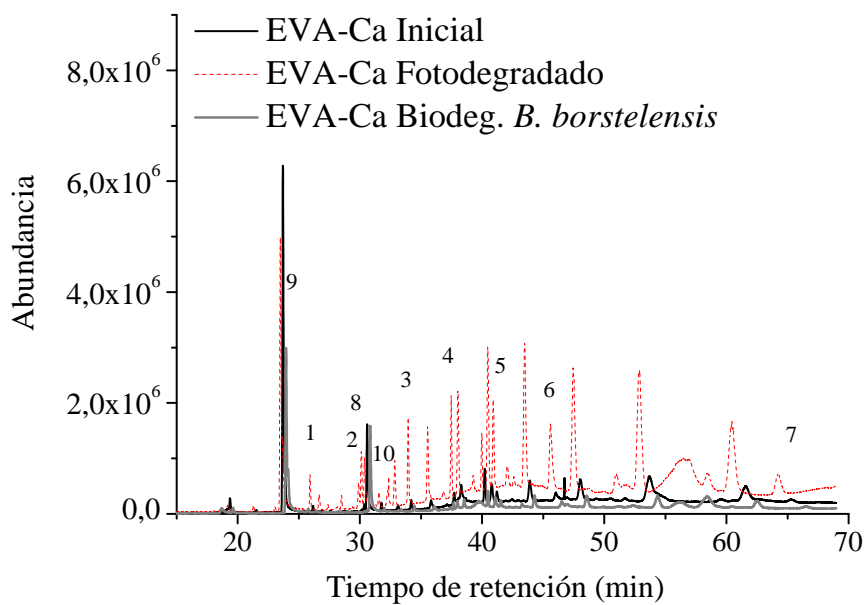


Figura 4: Cromatogramas GC-MS de los productos extraídos de los filmes de EVA con estearato de Ca, inicial, fotodegradado y biodegradado 90 días a 45 °C por *B. borstelensis*.

ANEXO II

El Trabajo realizado a lo largo de esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones y trabajos presentados en congresos:

PUBLICACIÓN 1.

PHOTODEGRADATION OF POLYETHYLENES: COMPARATIVE EFFECT OF FE AND CA STEARATES AS PRO-OXIDANT ADDITIVES. *J.L.Pablos, C.Abrusci, I.Marín, J.López-Marín, F.Catalina, E.Espí, T.Corrales. **Polymer Degradation and Stability** 95 (2010) 2057-2064.*

PUBLICACIÓN 2.

BIODEGRADATION OF PHOTODEGRADED MULCHING FILMS BASED ON POLYETHYLENES AND STEARATES OF CALCIUM AND IRON AS PRO-OXIDANT ADDITIVES. *C. Abrusci, J. L. Pablos, T. Corrales, J. López-Marín, I. Marín, F. Catalina. **International biodeterioration and biodegradation** 65 (2011) 451-459.*

PUBLICACIÓN 3.

PHOTODEGRADATION AND BIODEGRADATION BY BACTERIA OF MULCHING FILMS BASED ON ETHYLENE-VINYL ACETATE COPOLYMER (EVA). EFFECT OF PRO-OXIDANT ADDITIVES. *C. Abrusci, J. L. Pablos, I. Marín, E. Espí, T. Corrales, F. Catalina. **Journal of applied polymer science**. En impresión. ISSN: 00218995.*

PUBLICACIÓN 4. (EN PREPARACIÓN)

COMPARATIVE STUDY OF BACTERIAL BIODEGRADATION OF PHOTO- AND THERMO- DEGRADED POLYETHYLENE MULCHING FILMS CONTAINING IRON, COBALT AND MANGANESE STEARATES AS PRO-OXIDANTS ADDITIVES. *C. Abrusci, J.L. Pablos, I. Marín, J. López-Marín, T. Corrales, F. Catalina.*

CAPÍTULO DE LIBRO.

ENVIRONMENTAL AND BACTERIAL DEGRADATIONS OF AGRICULTURAL FILMS BASED ON POLYETHYLENES. EFFECT OF Ca AND Fe PRO-OXIDANTS IN THE POLYMER FORMULATION. *C. Abrusci, J. L. Pablos, T.*

Corrales, J. López-Marín, I. Marín, F. Catalina. *Recent Res. Microbiology*, 12 (2012) ISBN: 978-81-308-0467-5.

ASISTENCIA A CONGRESOS.

IX Reunión Grupo Especializado de Polímeros (GEP) RSEQ.

Año: 2009 **Título:** “ESTUDIO DE FOTODEGRADACIÓN DE FILMES DE POLIETILENO PARA ACOLCHADO AGRÍCOLA CON ESTEARATOS DE HIERRO Y CALCIO COMO AGENTES PROOXIDANTES ” (Cartel)

XXII Congreso nacional Sociedad Española Microbiología (SEM).

Año: 2009 **Título:** “ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN POR BACTERIAS DE FILMES AGRÍCOLAS DE ACOLCHADO ALTAMENTE FOTODEGRADADOS”. (Cartel)

XXXIX Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura.

Año: 2009 **Título:** “EL ESPESOR DE LOS MATERIALES BIODEGRADABLES DE ACOLCHADO COMO FACTOR LIMITANTE DE EMPLEO”. (Cartel)

XI Congreso Nacional de Materiales.

Año: 2010 **Título:** “ESTUDIO DE DEGRADACIÓN MEDIOAMBIENTAL DE FILMES AGRÍCOLAS DE ACOLCHADO CON ESTEARATOS DE Ca Y Fe COMO ADITIVOS PRO-OXIDANTES”. (Comunicación oral)

Macro2010: 43rd IUPAC World Polymer Congress.

Año:2010 **Título:**“BIODEGRADATION OF PHOTODEGRADED POLYETHYLENE FILMS BY BACTERIA. EFFECT OF CALCIUM AND IRON STEARATES AS PRO-OXIDANTS ADDITIVES.” (Cartel)

III Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

Año: 2010 **Título:**”ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN DE FILMES FOTODEGRADADOS DE POLIETILENO POR *Brevibacillus borstelensis*. EFECTO DE ADITIVOS PRO-OXIDANTES.” (Cartel)

European Polymer Congress 2011. XII Congress of the specialized group of polymers.

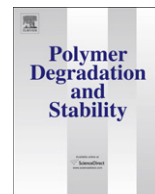
Año: 2011 **Título:** "PHOTODEGRADATION AND BACTERIAL BIODEGRADATION OF POLYETHYLENE-VINYL ACETATE (EVA) MULCHING FILMS. EFFECT OF CALCIUM AND IRON STEARATES AS PRO-OXIDANT ADDITIVES" (Cartel)

Congreso Nacional Sociedad Española Microbiología (SEM).

Año: 2011 **Título:** "ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE FILMES FOTODEGRADADOS DE ACOLCHADO BASADOS EN EL COPOLÍMERO DE ETILENO-ACETATO DE VINILO (EVA). EFECTO DE LA PRESENCIA DE ESTEARATOS DE CA Y FE COMO ADITIVOS PRO-OXIDANTES." (Comunicación oral)

XXIII Congreso Nacional Sociedad Española Microbiología (SEM).

Año: 2011 **Título:** "ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE FILMES FOTODEGRADADOS DE ACOLCHADO BASADOS EN EL COPOLÍMERO DE ETILENO-ACETATO DE VINILO (EVA). EFECTO DE LA PRESENCIA DE ESTEARATOS DE CA Y FE COMO ADITIVOS PRO-OXIDANTES." (Cartel)



Photodegradation of polyethylenes: Comparative effect of Fe and Ca-stearates as pro-oxidant additives

J.L. Pablos^a, C. Abrusci^b, I. Marín^b, J. López-Marín^c, F. Catalina^a, E. Espí^d, T. Corrales^{a,*}

^a Departamento de Fotoquímica de Polímeros, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, C.S.I.C., Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^b Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid-UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^c Departamento de Hortofruticultura, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, Mayor. 1., 30150 La Alberca, Murcia, Spain

^d Repsol, Ctra. A-5, Km. 18, Móstoles, 28931 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2010

Received in revised form

28 June 2010

Accepted 5 July 2010

Available online 8 August 2010

Keywords:

Photodegradation

Polyethylene

Pro-oxidant

Chemiluminescence

ABSTRACT

The effect of iron and calcium stearates on the degradation of polyethylene (LDPE and LLDPE), under natural and artificial exposure, has been studied. The activity of stearates has been evaluated by chemiluminescence and FTIR of polyethylenes. The analysis of the molecular weight changes and content of degradation products identified by GC–MS during ageing process confirmed their pro-degrading activity. Films containing stearates exhibited lower CL emission, and revealed the higher efficiency of Fe-Stearate compared to Ca-Stearate in decomposing hydroperoxides, leading to higher degradation during processing. The results were confirmed by TGA analysis, where the weight loss onset and T_{max} shifted to lower temperatures in polyethylenes with incorporation of Fe- and Ca-stearates compared to pure polymers.

Polyethylenes were outdoor and accelerated exposed, and CL measured at different period of times. Chemiluminescence temperature-ramping tests under nitrogen showed the formation of a peroxide peak at lower temperature, and a significant increase in carbonyl index for PE containing stearates was found by FTIR. The results were supported by GC–MS, where the concentration of extracted products identified in the polyethylenes containing Fe-stearate was significant, and a much greater decrease in molecular weight was determined by GPC, which confirmed the development of degradation for polyethylenes with Fe-Stearates in comparison to pure or Ca-stearate polyethylenes.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polyethylene is a non-biodegradable polymer widely used in the agricultural sector, including greenhouse and mulching films, and whose application lead to a large quantity of plastic waste causing serious environmental problems. The most common approach to render polyethylene oxobiodegradable in a realistic time frame is to incorporate pro-oxidants, [1] which induce abiotic (photo or thermal) oxidation, leading to the reduction of molecular mass to levels where the material becomes susceptible to microbial attack [2–6]. The transition metal ion complexes, especially in the form of stearates, possess a remarkable ability to decompose the hydroperoxides formed during the oxidation of polymers [7] and therefore they are used as pro-oxidant additives in most of the commercial photodegradable compositions. The catalytic activity of

any metal is dependent on several factors like its valency and the type of ligands to which it is associated. The catalytic effect is stronger for pro-oxidants based on metal combinations capable of yielding two metal ions of similar stability and with oxidation number differing by one unit only [8].

The ageing of polyethylenes is an area of continuous development, since it determines possible material applications. Different techniques have been used to study the mechanism of polymer degradation, including chemiluminescence (CL), which has become a competitive analytical technique for polymers, due to its offered advantages with respect to many conventional techniques [9]. Chemiluminescence from polymers is due to the recombination of secondary alkyl peroxy radicals, which promotes ketone products to its lowest triplet state and the radiative deactivation gives the light emission in the visible region [10]. The chemiluminescence emission can be related to the hydroperoxide (POOH) content, since generation of peroxy radicals depends on the peroxide concentration formed during processing or in-service life of the material under ambient conditions [11]. Several works have been devoted

* Corresponding author. Tel.: +34 915622900; fax: +34 915644853.

E-mail address: tcorrales@ictp.csic.es (T. Corrales).

exploring the use of chemiluminescence to study the thermal and photooxidative behaviour of polyethylenes in terms of their structure, influence of micron and nanoparticle titanium dioxide, effectiveness of the antioxidants, type and content of comonomer in copolymers [12–19]. Recently, chemiluminescence has been introduced to monitor degree of oxidation in polyethylene with pro-oxidant additives [20].

This work is concerned with the degradation behaviour, under natural and accelerated exposure, of LDPE and LLDPE containing two different pro-oxidant additives, iron and calcium stearates. The activity of stearates has been evaluated by following chemiluminescence of polyethylenes at different ageing times, and results obtained confirmed by analysis of the molecular weight changes and content of degradation products identified by GC–MS during ageing.

2. Experimental

2.1. Materials and polymer characterization

The polyethylene films of 25 microns thickness (LDPE and LLDPE) and polyethylene films with iron stearate (LDPE-Fe, LLDPE-Fe), or calcium stearate (LDPE-Ca, LLDPE-Ca) as pro-oxidant additives (at 0.2% w/w) were prepared by Repsol.

Molecular weight was measured by *Gel Permeation Chromatography* (GPC) on a Polymer Laboratories PL–GPC 220 apparatus with a differential refractive index detector. The mobile phase was 1,2,4-trichlorobenzene to which 2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) antioxidant (0.015%) was added. The analytical flow rate was 1 mL/min and the temperature was 160 °C. The values obtained were referenced to a universal curve with the following viscometric parameters $K = 3.95 \times 10^{-4}$ and $\alpha = 0.726$ (polyethylene).

2.1.1. FTIR

FTIR spectra were obtained using a Perkin Elmer BX-FTIR spectrometer. Oxidation rates were determined by using the standard carbonyl index method [21].

2.1.2. Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed on a Shimadzu DSC-50 instrument over the temperature range 30 °C–180 °C. The measurements were made at a heating rate of 10 °C min⁻¹ in an inert atmosphere of nitrogen and the instrument was calibrated with an indium standard ($T_m = 429$ K, $H_m = 25.75$ Jg⁻¹). To erase the thermal history of the material, first a heating ramp rate at 10 °C min⁻¹ was used, followed by a cooling ramp and a consecutive heating ramp of 10 °C min⁻¹ each. The melting peak (T_m) and the melting enthalpy (ΔH_m) were obtained, and percentages of crystallinity (%X_c) were determined using the reference of 293 Jg⁻¹ for crystalline polyethylene [22].

2.1.3. Thermogravimetric analysis

The TGA experiments were carried out in a TGA Q-500 (Perkin–Elmer). The heating rate for the dynamic conditions was 10 °Cmin⁻¹, and the nitrogen flow was maintained constant at 60 ml min⁻¹.

Identification of the degradation products extracted from polyethylenes was undertaken by gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) with an Agilent Technologies 6890N chromatograph coupled to a 5973 inert mass spectrometer using helium as the carrier gas, and equipped with an HP-5MS capillary column. The oven temperature was programmed from 80 °C to 250 °C (5 °Cmin⁻¹), and maintained for 30 min. After that, samples were injected at 250 °C. The degradation products were identified by comparing their mass spectrum with the one from the NST

Table 1

d.s.c. analysis data for initial and photodegraded polyethylenes under nitrogen.

Sample	Initial		Photodegraded	
	%X _c (%)	T _m (°C)	%X _c (%)	T _m (°C)
LDPE	19	107	25	112
LDPE-Fe	19	112	21	113
LDPE-Ca	21	113	25	114
LLDPE	25	123	27	123
LLDPE-Fe	24	115	28	116
LLDPE-Ca	25	116	28	117

database and checked by comparison of the retention times with that of naphthalene as reference sample. For that purpose, the extraction of degradation products from polyethylene samples was performed using 5 mg of sample, cut into small pieces, mixed with 10 ml chloroform in a 20 ml glass vial and ultrasonicated in a Branson 2210 apparatus for 2 h in a hot water bath held at 60 °C. The extract obtained was concentrated by total evaporation of solvent at room temperature. Afterwards, 2 ml of chloroform and 20 μl of stock chloroform–solution of naphthalene (1 g l⁻¹) as internal standard were added. The extract was filtered through a 0.2 mm filter prior to analysis [5] by GC–MS.

2.2. Chemiluminescence

Chemiluminescence emission of film samples was obtained as described earlier and using a CL400 ChemiLUME apparatus developed by Atlas Electric Devices Co [23]. Samples for chemiluminescence measurements were prepared by cutting circular specimens of 12 mm in diameter from the polymer films; hence the emission area was maintained constant in all the experiments. The film samples were held in aluminium dishes and two different types of tests were performed: A) Isothermal: samples of material are preheated up to the test temperature (170 °C) under nitrogen or oxygen, and the temperature of the test maintained constant. B) Dynamic: material samples are heated up with pre-test ramp (2 °C/min) under constant flow of nitrogen (50 ml/min). Chemiluminescence signal from film samples were collected in a water-cooled photon counting photomultiplier, which was previously calibrated using a radioactive standard provided by Atlas. The data collected were processed using the specific software supplied with the instrument.

2.3. Ageing

2.3.1. Natural (outdoor) weathering

Polyethylene films were mounted on metallic plates (1 × 4 cm) containing at least eighteen films samples per plate. The middle portion of the film was allowed to be exposed to sunshine. The plates were then placed on boards manufactured and placed at the CSIC (Madrid 40°24'N, 3°41'O) facing southwards in a 45° angle with the plane of the earth as per ASTM D1435-99. Exposed samples were periodically taken out and washed gently with

Table 2

Thermogravimetric analysis data for initial and photodegraded polyethylenes under nitrogen.

Sample.	T ₁₀ (°C)		T ₅₀ (°C)		T _{max} (°C)	
	Initial	Photodeg	Initial	Photodeg	Initial	Photodeg
LDPE	456	437	485	474	490	480
LDPE-Fe	431	381	474	470	480	480
LDPE-Ca	417	368	477	470	486	482
LLDPE	458	445	486	478	491	481
LLDPE-Fe	454	403	482	476	485	484
LLDPE-Ca	453	446	482	479	487	483

Table 3

Average Molecular Weights and Polydispersity of initial and photodegraded polyethylenes.

Sample	Initial			Photodegraded		
	M_n	M_w	PD	M_n	M_w	PD
LDPE	17230	73150	4.3	8510	37890	4.4
LDPE-Fe	14370	99620	6.9	2210	5310	2.4
LDPE-Ca	14970	94290	6.3	3110	8090	2.6
LLDPE	38400	94300	2.4	16500	49830	3.0
LLDPE-Fe	31550	83340	2.6	3060	14290	4.7
LLDPE-Ca	30920	84370	2.7	8950	25840	2.9

distilled water and dried before full characterization. Incident energy was measured simultaneously to the weathering assay using an accumulative photodiode (300–3000 nm) system Zipp & Zonen CC2 integrator.

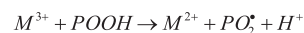
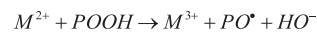
2.3.2. Accelerated (artificial) weathering

The artificially simulated (accelerated) weathering was carried out in a ATLAS/SUNTEST XLS provided with a 2500W Xenon lamp and a solar filter (borosilicate). Incident energy was fixed using an International Light IL-700 radiometer (photodiode IL-PT 171C) at 550 W/m² in the interval 300–800 nm. Temperature was maintained constant at 45 °C during the testing program set. Exposed samples were mounted on metallic plates (1 × 4 cm) and were periodically taken out and characterized.

3. Results and discussion

Firstly, the pure and containing stearates polyethylenes were characterized. The melting point (T_m) and the degree of crystallinity (% X_c) of samples were determined from the peak of endothermic melting transition in the differential scanning calorimetric analysis (DSC), Table 1. As expected, lower values of the melting temperature and the crystallinity were observed for LDPE respect to LLDPE, since the increase of branching degree drives to the enhancement of interfacial region. For LDPE, the melting point was observed at ~110 °C and increases slightly after blending with Fe- and Ca-stearates. In the case of LLDPE, melting point was determined at ~123 °C, and a slight decrease was observed after addition of stearates.

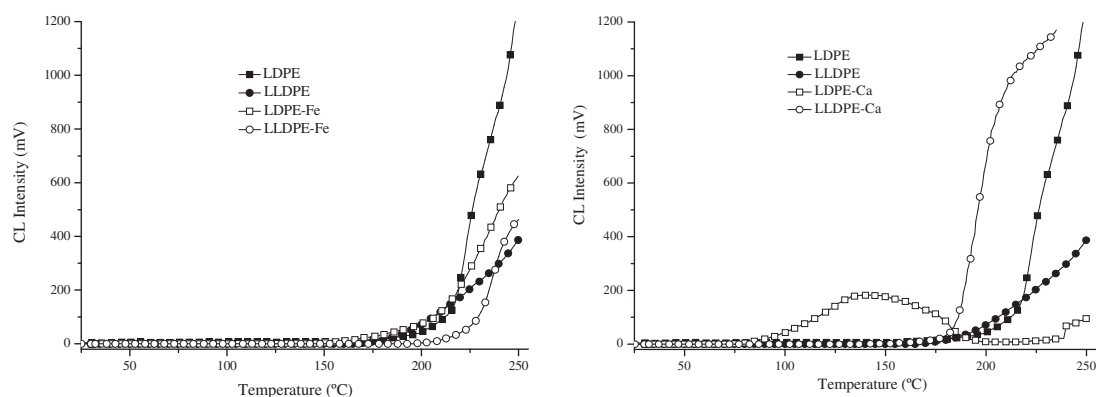
The thermal stability of the polymer samples was studied by non-isothermal thermogravimetric analysis under nitrogen. Classical one-step degradation curves were obtained, which is associated to random scission as primary pathway for degradation in polyethylenes. The onset temperature of the degradation, as measured by temperature at which 10 and 50% mass loss occur (T_{10}

**Scheme 1.**

and T_{50} , respectively), and the maximum decomposition temperatures (T_{max}), are summarised in Table 2. A slight trend towards destabilization can be observed for LLDPE with stearates in comparison to pure polyethylene. Otherwise, a larger temperature shift of the weight loss onset and T_{max} was determined in LDPE with incorporation of Fe- and Ca-stearates. This effect indicated the pro-oxidative nature of stearates during processing, which resulted more dramatic with the increase of branching degree, since random abstraction of hydrogen atoms to drive scission of the backbone would be more favoured.

Changes in molecular weight distribution confirmed the obtained results, Table 3. Addition of stearates to LDPE leads to further lowering in number average molecular weight and higher polydispersity. A similar effect was observed on the LLDPE-Fe and LLDPE-Ca samples respect to LLDPE, where degradation appears to be evident respect to pure polyethylene.

The analysis of non-isothermal chemiluminescence runs in nitrogen atmosphere for initial samples provides a useful tool to evaluate the activity of stearates as pro-oxidants during processing of materials, Fig. 1. The CL-temperature curves for pure PE showed the increase of intensity above ~110 °C, which corresponds to the molten state region, until maximum temperature 250 °C was reached. In the melt, the mobility of the peroxy radicals and their bimolecular termination reaction, responsible for the chemiluminescence emission in the polymers, is favoured. LDPE exhibited higher chemiluminescence emission respect to LLDPE sample in the whole range of temperatures studied, which would indicate that higher amounts of hydroperoxides were induced by oxidation during film processing. The results obtained could be explained in terms of influence of structure, and considering the mechanism of thermal degradation of polyethylene [24]. It assumes random scission of the carbon–carbon backbone to form secondary alkyl radicals in the earlier stages, followed by random abstraction of hydrogen atoms by these alkyl radicals, and scission of the backbone at a β -(C–C) bond to the new radical to give an allylic end group and a radical chain end as products. As consequence of the incorporation of α -olefin and the increase on branching degree on LDPE, the scissions at C–C and C–H bonds which involve a tertiary carbon atom may be easier than for linear polymers such as metallocene polyethylene. Also, others considerations should be taken into account, such as (i) the polymer is practically oxidised only in the amorphous phase, and the increase of branching degree drives to the enhancement of

**Fig. 1.** Chemiluminescence temperature-ramping curves obtained for initial polyethylene films under nitrogen.

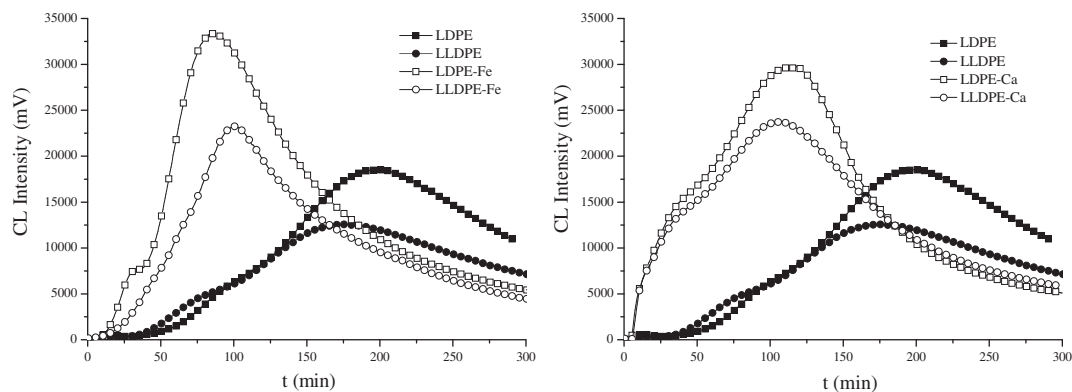


Fig. 2. Chemiluminescence curves for initial polyethylene films obtained at 170 °C under oxygen.

interfacial region and for instance to decrease of crystallinity, as it is showed in Table 1, (ii) the decrease of the molecular weight in LDPE which significantly would increase the amount of chain ends, (terminal bonds, unsaturation or initiator moieties), and contributes to degradation of polyethylene.

A similar trend was observed with the incorporation of Fe-Stearate on both polyethylenes, although lower CL intensity was observed. It would indicate that this stearate complex catalyzed the decomposition of hydroperoxides, Scheme 1, leading to the generation of free radicals and for instance, the degradation of materials during processing [2,20].

In the case of Ca-Stearate the catalytic effect in the polyethylene degradation was also significant. As it was previously described in absence of stearates, higher degradation in LDPE-Ca was observed respect to LLDPE-Ca, as consequence of the increase on branching degree on LDPE. For LLDPE-Ca the CL increase was shifted towards lower temperature, and for LDPE-Ca the increase disappears and the formation of peroxide peak, related to concentration of hydroperoxides in samples, was observed at lower temperature. The results obtained are on agreement with the decrease of stability observed by other authors [25,26] using a mixture of CaCO_3 and stearic acid in photo-aged polypropylene. The mechanism of degradation of polymer containing Ca-Stearate is still not clear. Recently, Fechine et al. [27,28] reported the pro-oxidant effect of Ca-Stearate on polypropylene, and proposed that carbonyl groups generated by the photo-oxidation absorb light and produce excited states, in which carbonyl groups exist as biradicals. Those species could abstract hydrogen from the polymer chain contributing to the formation of radicals.

The increased pro-oxidative ability of iron stearate may be related to the fact that pro-oxidants based on metal combinations capable of yielding two metal ions of similar stability and with oxidation number differing by one unit only exhibited stronger catalytic effect [8]. Also it may be considered that iron stearate melts at higher temperature than calcium stearate (177 °C and 155 °C respectively), and the additive is capable of blending easily with the base polyethylene.

The activity of pro-oxidants on thermal oxidation of polyethylenes is showed on CL intensity–time runs under oxygen, Fig. 2. As expected, the chemiluminescence emission was enhanced with respect to that obtained under nitrogen, since in such conditions the samples were oxidised in a diffusion-controlled reaction simultaneously to the emission. The isothermal CL curves exhibited double stage of oxidation, oxygen independent and oxygen diffusion-controlled reactions, with different oxidation rate during the processes. When the polymer oxidation progress in at both high concentration of oxygen and temperature, the system reaches the diffusion-controlled mechanism of oxidation, and the rate of auto-oxidation increases to the level where the diffusion and solubility of oxygen is limited. As result, a reduction of the oxidation reaction, ν_{ox} , takes place [29], which is reflected as a break in isothermal CL curve of oxidation [30]. The first maxima appeared as shoulder of the curve and the time and chemiluminescence intensity of second maxima was seen to dependent on the structure of polymer and highly affected with incorporation of stearates. LDPE exhibited higher chemiluminescence emission respect to LLDPE sample, associated to the increase of branching degree. For polyethylene samples containing pro-oxidant chemiluminescence emission

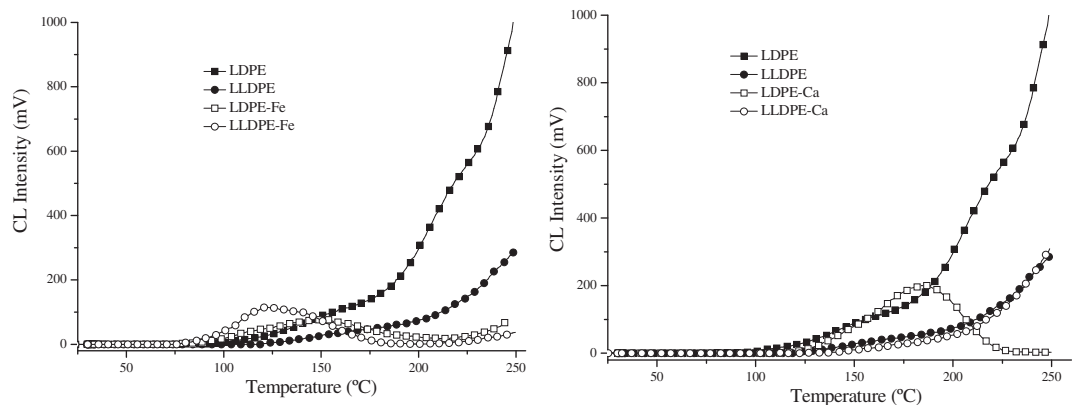


Fig. 3. Chemiluminescence temperature-ramping curves obtained under nitrogen for polyethylene films after 9 weeks of outdoor degradation.

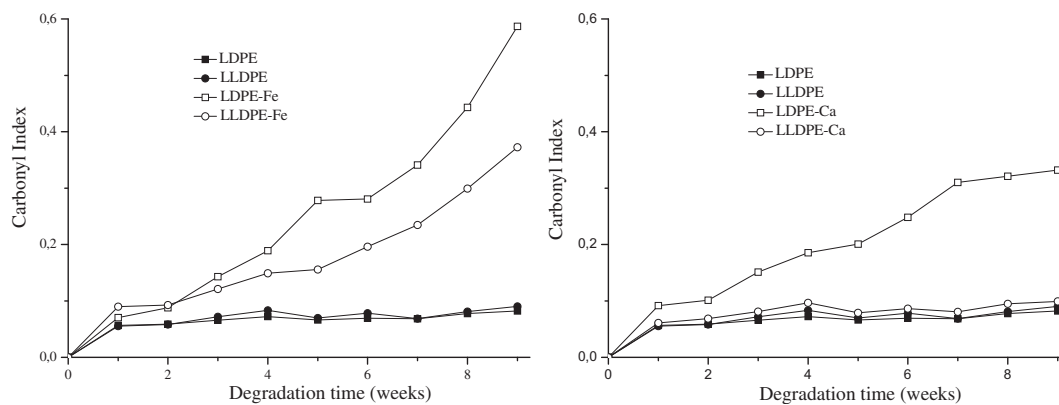


Fig. 4. Carbonyl index of polyethylene samples at different outdoor degradation time.

enhanced and lower oxidation induction time (OIT) respect to pure polymers were determined. It may be associated to the decomposition of hydroperoxides catalyzed by transition metal ion complexes, leading to the generation of free radicals which initiate the oxidation of the polyethylene. Also, the dependence of polyethylenes oxidation on pro-oxidant type was evaluated. The incorporation of Fe-Stearate caused an increase of oxidation rate and higher chemiluminescence intensity respect to Ca-Stearate, where longer time for second maxima was observed.

Since the measurement of chemiluminescence under an inert gas, gives information on the intrinsic oxidation state of the sample, the degradation of polyethylenes after 9 weeks of natural weathering was studied by chemiluminescence temperature-ramping tests under nitrogen, Fig. 3. In general, CL emission shifted towards lower temperature. The effect of pro-oxidants was evidently significant, and in presence of iron stearate, the formation of peroxide peak was observed at lower temperature. It must be pointed out that on samples films containing pro-oxidants and subjected to outdoor ageing, a gradual increase in the number of cracks was observed, followed by fragmentation after 9 weeks of testing. In contrast, at that ageing time, pure samples remained intact and no visible deterioration was substantial.

FTIR analysis was used to provide information regarding accumulation of carbonyl-containing products as a function of time. The relationship of the results obtained by FTIR and chemiluminescence may be analysed according to the well established oxidation mechanism of polyolefins, which among the various reactions that can take place, the formation of hydroperoxides and their decomposition to give ketone products are involved. The carbonyl index (CI) was calculated at different ageing times, and the

data are compiled in Fig. 4. Both, LDPE and LLDPE exhibited the lowest values of CI, associated with a low oxidation level generated during exposure, which is in agreement with the chemiluminescence results. However, CI for polymers containing stearates was seen to gradually increase from the beginning of oxidation up to 9 weeks of ageing. The incorporation of iron stearate into the polymer led to a significant increase in CI, which indicated that activity of that pro-oxidant appears to be greater on degradation of polyethylenes than calcium stearate.

For practical reasons, characterization of oxidation progress of polymers during photoageing has often been determined in short-term laboratory analysis. An extensive study of natural and accelerated photoageing process of polyethylenes should contribute to obtain coherent information about mechanisms operating by pro-oxidants in the photo-oxidation. Samples containing stearates were aged for a certain period under artificially photo-aged. Subsequently, isothermal chemiluminescence analysis in nitrogen atmosphere was undertaken, which was related to the amount of hydroperoxides accumulated in the material during ageing.

In general, for the polyethylenes containing stearates, the chemiluminescence intensity determined as the peak-top intensity (I_{CL-max}) at 170 °C, was seen to increase as well as carbonyl index up to 200 h of ageing, followed by a gradual decrease of chemiluminescence intensity and an abrupt increase in the formation of carbonyl species by FTIR, which indicated that decomposition of peroxides prevailed over their formation. For LLDPE-Ca, CL emission continued increasing after 500 h of photodegradation, accompanying the enhancement of the absorbance corresponding to carbonyl species in the FTIR spectra, Fig. 5. Those results would reflect the higher degree of degradation for the polyethylenes in

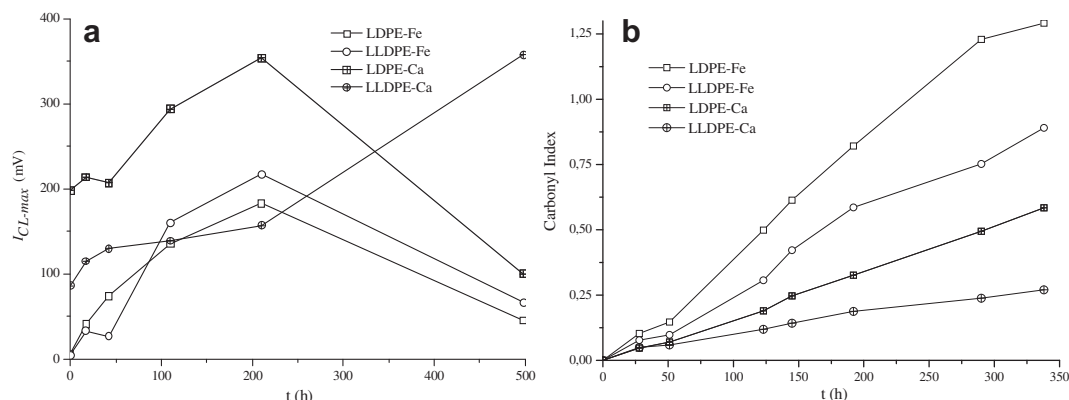


Fig. 5. Chemiluminescence intensity determined at 170 °C under nitrogen (a) and Carbonyl Index (b) versus accelerated ageing time of polyethylene films.

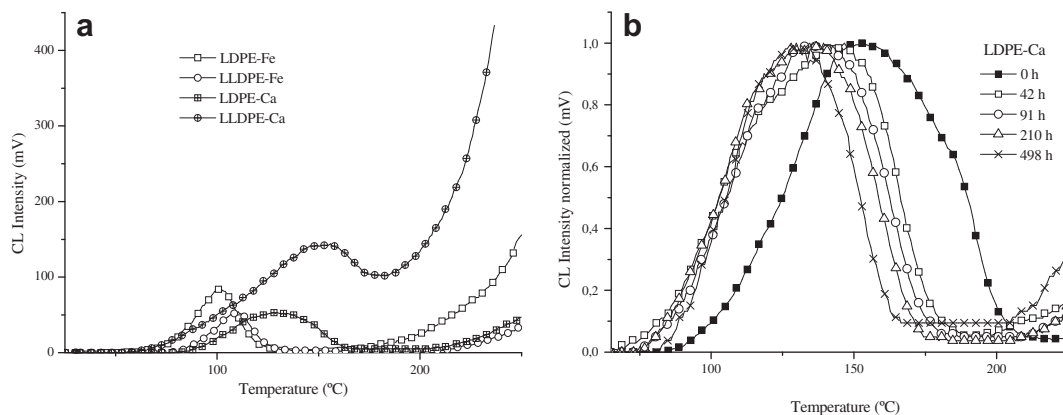


Fig. 6. Chemiluminescence temperature-ramping curves obtained under nitrogen for polyethylene films under accelerated ageing, a) after 498 h of degradation time b) at different degradation times.

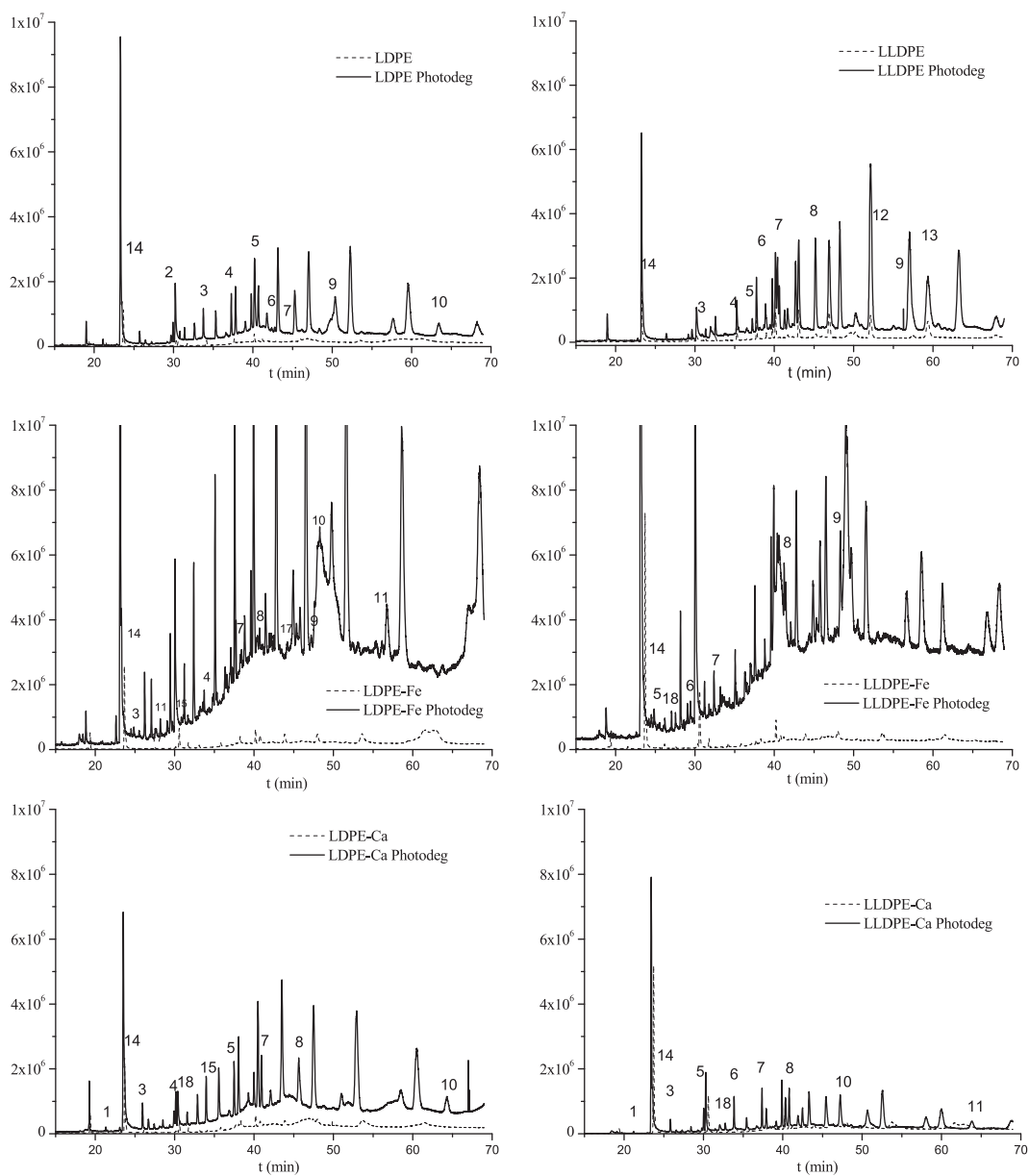


Fig. 7. GC-MS chromatogram of the products extracted from initial and photodegraded samples. (1) Hexadecane, (2) Heptacosane, (3) Octadecane, (4) Tetracosane, (5) Hexacosane, (6) Heptacosane, (7) Eicosane, (8) Docosane, (9) Octacosane, (10) Nonacosane, (11) Tricontane, (12) Hexatricosane, (13) Dotriacontane, (14) Tetradecanol, (15) Hexadecanol, (16) 1-Pentadecene, (17) 1-Hexacosene, (18) 1-Octadecene.

presence of Fe-Stearate, and correlated with those obtained by chemiluminescence analysis under oxygen atmosphere, where the chemiluminescence intensity of second maxima was seen to enhance and shift to shorter time.

The analysis of non-isothermal chemiluminescence runs in nitrogen atmosphere for samples photodegraded followed the same trend described for outdoor exposure samples. Although CL emission shifted towards lower temperature and higher CL intensity were determined under accelerated conditions. The results confirm a higher degree of degradation of those samples, which would be on agreement with the higher content of carbonyl species analysed by FTIR. It was consequence of the higher total radiation received under artificial conditions (1375 MJ/m² and 1117 MJ/m², accelerated and natural ageing respectively). Despite outdoor exposure resulted in a lower degree of degradation, the visible deterioration of samples was substantial compared to accelerated aged samples, and it may be due to the simultaneous action of UV radiation, heat and mechanical agitation of the film samples caused by winds and rains.

The CL-ramping analysis under nitrogen was undertaken at different degradation time to follow the evolution of curves during ageing process. Fig. 6 showed the normalized curves for LDPE-Ca. The T_{max} of the peak shifted to lower temperatures in photo-degraded samples. The peak is associated to CL of decomposition of peroxides accumulated in the polymer during oxidation, and the decrease may be due to decreasing stability of peroxides. This effect has been observed by others authors [25] and it has been related to the structure of hydroperoxides or to the presence of compounds catalyzing the peroxides decomposition, as it is the case.

The analyses of products extracted from initial and degraded polyethylenes were undertaken by Gas chromatography mass spectrometry, which allows identifying the species generated during ageing [31]. The degradation products were identified by comparing their mass spectrum with the one from the NST database and checked by comparison of the retention times with that of naphthalene as reference sample. Fig. 7 shows the chromatograms of products extracted from polyethylenes. In general, the relative amount of the products obtained for initial samples was very low and increased after UV exposure. For all samples, the identified products were basically a series of low molecular hydrocarbons of less than 30 carbon atoms, and their concentration increased as the molecular weight became higher. In the case of polyethylenes containing Fe-stearate, the concentration of extracted products was significant, which confirmed the development of degradation process in comparison to pure or Ca-Stearate polyethylenes.

The percentage of crystallinity and melting temperature for all the materials after accelerated photoageing were determined, Table 1. An increase in crystallinity was observed, which may be attributed to both annealing and oxidation followed by the scission of constrained chains in the amorphous region, which leads to relaxation of local stresses and subsequently allows the crystallization of released chains. A clear destabilization after photo-degradation for polyethylenes with stearates in comparison to pure polyethylenes was observed by non-isothermal thermogravimetric analysis under nitrogen, Table 2. The weight loss onset decreased for all samples, being more dramatic at lower temperature (T_{10}), as consequence of pro-oxidant activity of stearates to drive chain scission and the subsequent formation of low molecular weight fragments.

Changes in molecular weight distribution confirmed the obtained results. In Table 3 the average molecular weight (Mw), number average molecular weight (Mn) and polydispersity for initial and photodegraded samples are summarised. There is a much greater decrease in molecular weight for LDPE-Fe and LDPE-Ca aged respect to LDPE, indicating the formation of low

molecular weight compounds, which may be attributed to chain scission during ageing. It has been observed that in presence of stearates, the wide initial molar mass distribution led to narrower distributions and shifted to lower molar masses. A similar effect was observed on the LLDPE samples, unaged polyethylenes showed similar weight distributions, but the degradation appears to be slightly higher for the LLDPE-Fe than for the LLDPE-Ca.

4. Conclusions

The present work reveals the different activity of iron and calcium stearates as pro-oxidants in LDPE and LLDPE under natural an artificial exposure. A decrease of CL intensity was observed with the incorporation of Fe-stearate in different polyethylenes, which indicated the efficiency of this stearate complex in decomposing hydroperoxides, leading to the generation of free radicals and for instance, the degradation of materials during processing. For samples containing Ca-stearate the formation of a peroxide peak, was observed at lower temperature. These results were in agreement with destabilization observed by thermogravimetric analysis for LLDPE with stearates, where a larger temperature shift of the weight loss onset and T_{max} was found in polyethylenes with incorporation of Fe- and Ca-stearates compared to pure polymers.

The effect of pro-oxidants was clearly significant in polyethylenes aged under natural weathering. Chemiluminescence temperature-ramping tests under nitrogen showed the formation of peroxide peak at lower temperature, and a significant increase in carbonyl index for PE containing stearates was determined by FTIR.

Samples under accelerated degradation followed the same trend described for outdoor exposure samples. Although CL emission shifted towards lower temperature and higher CL intensity were determined as consequence of the higher total radiation received under artificial conditions. In the case of polyethylenes containing Fe-stearate, the concentration of extracted products identified by GC-MS was significant, and a much greater decrease in molecular weight was determined, which confirmed the development of degradation process for polyethylenes with Fe-stearates in comparison to pure or Ca-Stearate polyethylenes.

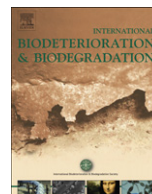
Acknowledgement

The authors would like to thanks to the MICINN (Spain) for financial support (MAT2009-09671). One of the authors C.A. would also like to thank to Ramón y Cajal Programme.

References

- [1] Roy PK, Surekha P, Rajagopal C, Choudhary V. Effect of cobalt carboxylates on the photo-oxidative degradation of low-density polyethylene. Part-I. *Polym Deg Stab* 2006;91:1980–8.
- [2] Scott G, Wiles DM. Programmed-Life plastics from polyolefins: a new look at sustainability. *Biomacromolecules* 2001;2:615–22.
- [3] Kyrikou I, Briassoulis D. Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. *J Polym Environ* 2007;15:125–50.
- [4] Chiellini E, Corti A, Swift G. Biodegradation of thermally-oxidized, fragmented, low density polyethylenes. *Polym Deg Stab* 2003;81:341–51.
- [5] Roy PK, Titus S, Surekha P, Tulsı E, Deshmukh C, Rajagopal C. Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polym Deg Stab* 2008;93:1917–22.
- [6] Ojeda TFM, Dalmolin E, Forte MMC, Jacques RJS, Bento FM, Camargo FAO. Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. *Polym Deg Stab* 2009;94:965–70.
- [7] Albertsson AC, Barenstedt C, Karlsson S. Abiotic degradation products from enhanced environmentally degradable polyethylene. *Acta Polym* 1994;45: 97–103.
- [8] Jakubowicz I. Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE). *Polym Deg Stab* 2003;80:39–43.
- [9] Peinado C, Allen NS, Salvador EF, Corrales T, Catalina F. Chemiluminescence and fluorescence for monitoring the photooxidation of an UV-cured aliphatic polyurethane-acrylate based adhesive. *Polym Deg Stab* 2002;77:523–9.

- [10] Schard MP, Russel CA. Oxyluminescence of polymers. I. General behavior of polymers. *J Appl Polym Sci* 1964;8:985.
- [11] Kron A, Stenberg B, Reitberg T, Billingham NC. Chemiluminescence from oxidation of polypropylene: correlation with peroxide concentration. *Polym Deg Stab* 1996;53:119–27.
- [12] Corrales T, Peinado C, Allen NS, Edge M, Sandoval G, Catalina F. A chemiluminescence study of micron and nanoparticle titanium dioxide: effect on the thermal stability of metallocene polyethylene. *J Photochem Photobiol A Chem* 2003;156:151–60.
- [13] Corrales T, Catalina F, Peinado C, Allen NS, Montan E. Photooxidative and thermal degradation of polyethylenes: interrelationship by chemiluminescence, thermal gravimetric analysis and FTIR data. *J Photochem Photobiol A Chem* 2002;147:213–24.
- [14] Peinado C, Corrales T, García-Casas MJ, Catalina F, Ruiz Santa Quiteria V, Parellada MD. Chemiluminescence from poly(styrene-*b*-ethylene-*co*-butylene-*b*-styrene) (SEBS) block copolymers. *Polym Deg Stab* 2006;91:862–74.
- [15] George GA. Developments in polymer degradation-3. London: Applied Science Publishers; 1981. p.173.
- [16] Celina M, George GA, Billingham NC. Polymer durability: degradation, stabilization and lifetime prediction [Chapter 11]. In: Clough RL, Billingham NC, Gillen KT, editors. *Advances in chemistry series 249*. Washington, DC: American Chemical Society; 1996. p. 159.
- [17] Matisova-Rychla L, Rychly J. in reference 15, [Chapter 12], pp. 185–197.
- [18] Dudler V, Lacey DJ, Kröhnke C. Chemiluminescence from polypropylene. Part 3: application to the study of antioxidant effectiveness. *Polym Deg Stab* 1996;51:115–24.
- [19] Corrales T, Escudero M, Quijda I, Catalina F, Abrusci C. A chemiluminescence study on thermal and photostability of ethylene/ α -olefin copolymers synthesized with *rac*-Et(Ind)₂ZrCl₂/MAO catalyst system. *Polym Deg Stab* 2009;45:2708–16.
- [20] Koutny M, Vaclavkova T, Matisova-Rychla L, Rychly J. Characterization of oxidation progress by chemiluminescence: a study of polyethylene with pro-oxidant additives. *Polym Deg Stab* 2008;93:1515–9.
- [21] Allen NS, Edge M. *Fundamentals of polymer degradation and stabilisation*. Oxford: Elsevier Applied Science Publishers Ltd; 1992.
- [22] Flory PJ, Vrij A. Melting points of linear-chain homologs. The normal paraffin hydrocarbons. *J Am Chem Soc* 1963;85:3548.
- [23] Catalina F, Peinado C, Allen NS, Corrales T. Chemiluminescence of polyethylene: the comparative antioxidant effectiveness of phenolic stabilizers in low-density polyethylene. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 2002;40:3312.
- [24] Jirackova-Audouin L, Verdu J. Chemiluminescence of hydrocarbon polymers. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 1987;25:1205.
- [25] Benavides R, Ponce-Ibarra VH, Reyes-Vielma B, Billingham NC. Environmental degradation of highly loaded polypropylene. *J Vinyl Addit Techn* 2003;9:32–40.
- [26] Benavides R, González-Hernández R, González-Cantú MC, Reyes-Vielma B, Billingham NC. Accelerated degradation of highly loaded polypropylene. *J Vinyl Addit Techn* 2003;9:41–9.
- [27] Fechine GJM, Demarquette NR. Cracking formation on the surface of extruded photodegraded polypropylene plates. *Polym Eng Sci*; 2008:365–72.
- [28] Fechine GJM, Rosa DS, Rezend ME, Demarquette NR. Effect of UV radiation and pro-oxidant on PP biodegradability. *Polym Eng Sci*; 2009:123–8.
- [29] Zlatkevich L. Chemiluminescence study of polymer oxidative stability. *J Polym Sci Part B Polym Phys* 1985;23:1691.
- [30] Broska R, Rychly J. Double stage oxidation of polyethylene as measured by chemiluminescence. *Polym Deg Stab* 2001;72:271–8.
- [31] Contat-Rodrigo L, Haider N, Ribes-Greus A, Karlsson S. Ultrasonication and microwave assisted extraction of degradation products from degradable polyolefin blends aged in soil. *J Appl Polym Sci* 2001;79:1101–12.



Biodegradation of photo-degraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives

C. Abrusci^a, J.L. Pablos^b, T. Corrales^b, J. López-Marín^c, I. Marín^a, F. Catalina^{b,*}

^aDepartamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bDepartamento de Fotoquímica, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^cDepartamento de Hortofruticultura, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, Mayor 1, 30150 La Alberca, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2010

Received in revised form

3 October 2010

Accepted 4 October 2010

Available online 18 February 2011

Keywords:

Polyethylene

Biodegradation

Pro-oxidants

Agriculture

Mulching films

Bacteria

ABSTRACT

Polyethylene film materials persist in the environment for a long time. Several bacterial species have been isolated from films buried in soil located in Murcia, Spain. Bacterial strains were characterized with a combination of culture-dependent methods and sequencing of part of the 16S ribosomal RNA gene (rDNA) after amplification by polymerase chain reaction (PCR). Three bacterial species common in soil were found attached to the polymer and identified as *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, and *B. subtilis*. These microorganisms, as well as *Brevibacillus borstelensis*, were tested for biodegradation susceptibility at 30 and 45 °C on highly photo-degraded polyethylene films (500 h under irradiation of Xe-Lamp-solar filter) that contained calcium and iron stearates as pro-oxidant additives. Biofilm formation developed on the photo-degraded materials after one week of bacterial treatment. Biodegradation of the polyethylene films was studied by chemiluminescence, ATR–FTIR, and GC-product analysis and the data confirm a more efficient biodegradation on the bioassays carried out at higher temperature. The CL emissions due to decomposition of oxidation species take place at lower temperatures; the decrease of carbonyl index and the disappearance of photogenerated low-molecular products with biodegradation were more efficient on the biodegraded films at 45 °C. Also, mineralization was evaluated by carbon dioxide measurements using an indirect impedance technique. Biodegradation by *B. borstelensis* and MIX at 30 °C was slow and in the range of 0.7–1.2% of mineralization after 90 days of bacterial bioassay. At 45 °C biodegradation was more efficient and in particular in the more photo-degraded films containing Ca and Fe stearates where mineralization extents reached values of 11.5% with *B. borstelensis* and 7–10% with the mixture of *Bacillus* (MIX).

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The problems associated with the disposal of agricultural plastic wastes become increasingly severe with time. Nowadays, plasticulture (the use of plastics in agriculture) results in increased yields, earlier harvests, less use of chemicals such as herbicides and pesticides, better protection of food products through mitigation of extreme weather changes, and more efficient water conservation. Agricultural films, mainly based on polyethylenes, are used as coverings for greenhouses or tunnels over crop rows, as silage covers, as bale-wrap films, and as mulching films to cover soil. The rate of biodegradation of polyethylene (PE), even during many years of exposure to microbial consortia of soil (10–32 y), has been found to be very low, thus accounting for less than 1% carbon

mineralization (Albertsson and Karlsson, 1990; Otake et al., 1995). In the past few years, PE films containing pro-oxidant additives have been the subject of several studies and it has been demonstrated that the use of suitable pro-oxidants as additives on conventional low-density polyethylene (LDPE) induces substantial oxidation of the materials. Pro-oxidants are transition metal ion complexes and they are added to polyethylene in the form of either stearates or other organic ligand complexes. The most commonly used pro-oxidants are Fe³⁺, Mn²⁺, and Co²⁺ stearates (Jakubowicz, 2003; Albertsson et al., 1993). Among them, Fe³⁺ initiates photo-oxidative degradation, whereas Mn²⁺ and Co²⁺ initiate a thermo-oxidation process (i.e., oxidation without the influence of light intensity).

The objective of this mechanism of polyethylene degradation, known as “oxo-biodegradation”, is to promote, first, abiotic (photo or thermo) oxidation, and second, microbial biodegradation. Initial abiotic oxidation is an important stage as it determines the rate of the entire process. In the first abiotic stage, heat mainly from

* Corresponding author. Tel.: +34 91 562 29 00; fax: +34 91 564 48 53.
E-mail address: fcatalina@ictp.csic.es (F. Catalina).

sunlight (UV radiation) caused macromolecular chain scission and the film is destabilized through embrittlement, becoming fragile and fragmented. In a second stage, these fragments are intended to be biodegradable by microorganisms in soil or during composting. Mulching film fragments are difficult to collect from the soil since erosion by wind and rain contribute to complete the breakdown of the embrittled film into friable powder. Most of the studies on the biodegradability of polyolefins containing pro-oxidants have been carried out on complex solid media such as soil and compost, but only recent research supports the idea that such materials are biodegradable (Chiellini et al., 2003, 2007; Jakubowicz, 2003). In these works, the presence of pro-oxidants in PE films induces substantial oxidation of the materials with consequent fragmentation, drastic decrease of molecular weight, and wettability increases followed by a fairly high extent of mineralization (60–70%) in soil burial tests (Chiellini et al., 2003; Jakubowicz, 2003) and fixation of carbon (Chiellini et al., 2007) into cell biomass (8–10%).

In this paper, we have compared the biodegradation of two polyethylene materials (low-density polyethylene, LDPE; and linear low-density polyethylene, LLDPE) highly photo-degraded in a previous work (Pablos et al., 2010) and containing calcium and iron stearates as pro-oxidant additives in their formulations. Biodegrading bacterial strains were isolated and identified in this work from samples exposed to agricultural soils in Murcia, Spain. Also, together with a characterization study of the biodegraded samples, two different techniques were used in this work to study biodegradation of polyethylene films, measurement of the carbon dioxide production by indirect impedance, and chemiluminescence emission of film samples. Both techniques have been previously employed and were proven useful in studying polymer biodegradation (Abrusci et al., 2004b, 2007b). The emission of chemiluminescence, thermally induced, from polymer samples in an inert gas, such as nitrogen, is proportional to the hydroperoxide content formed during processing of the material and, of course, highly enhanced during the degradation processes. In this study, biodegradation tests on discoid fragments of polyethylene films were carried out in silica with controlled inocula of the isolated *Bacillus* strains. Also, a strain of *Brevibacillus borstelensis* was used due to the biodegradation potential of this bacterium on photo-degraded polyethylene and the results were compared with those obtained using the mixture of isolated *Bacillus*. Evidence of biofilm formation on the polyethylenes was confirmed by contact angle, ATR–FTIR, and ESEM techniques after 7 days of bioassay. Biodegradation was evaluated by measuring the amount of carbon dioxide produced by the bacteria at 30 and 45 °C. After 90 days of this bacterial treatment under controlled conditions, the biodegraded polyethylene films were studied by ATR–FTIR and chemiluminescence.

2. Materials and methods

2.1. Polyethylene films and pro-oxidants

Two polyethylene grades were selected for this study: low-density polyethylene (LDPE) and linear low-density polyethylene (LLDPE). Pro-oxidant additives used in this work, calcium and iron stearates, were incorporated into the film formulations at a concentration of 0.2%. Films used in this work, having a thickness of 25 microns, were prepared and supplied by Repsol.

The characteristics of polyethylene materials, initially and photo-degraded, determined in an earlier work (Pablos et al., 2010), are reported in Table 1.

Table 1

Number-Average Molecular Weight (M_n), Weight-Average Molecular Weight (M_w) and Polydispersity (PD) of original and accelerated photo-degraded polyethylenes used in this work.

Sample	Original			Photo-degraded		
	M_n	M_w	PD	M_n	M_w	PD
LDPE	17230	73150	4.3	8510	37890	4.4
LDPE-Fe	14370	99620	6.9	2210	5310	2.4
LDPE-Ca	14970	94200	6.3	3110	8090	2.6
LLDPE	38400	94300	2.4	16500	49830	3.0
LLDPE-Fe	31550	83340	2.6	3060	14300	4.7
LLDPE-Ca	30920	84370	2.7	8950	25840	2.9

2.2. Isolation and PCR amplification and sequencing of cell isolates

Fragments of polyethylene films (2 × 10 cm) prepared in this work were scattered in April 2009 in an agricultural field of vegetables located in Torre Pacheco, Murcia, Spain. Films collected after 30 days for microbial identification showed characteristic microbial colonization on their surface. Further examination was performed on the strains identified as bacilli. First, PE films contaminated with bacteria were cultured and isolated at 45 °C with trypticase–soya–agar (TSA).

2.2.1. PCR amplification of 16S rRNA

DNA from the enrichment culture was extracted using an Ultra Clean microbial DNA isolation kit (MO BIO Labs., Inc., Solana Beach, CA), following the manufacturer's directions, and purified using a DNA purification JetQuick kit (Genomed).

The 16S rRNA genes were amplified by PCR using universal primers for bacteria domain 27F (5'-AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-TAC GG(CT) TAC CTT GTTACG ACT T-3'). Amplifications were performed using a Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) in a final volume of 50 µl, each containing: 1 mM of dNTPs, 3 mM MgCl₂, 1 mM of each primer, 1 × PCR buffer, and 1 U of Taq DNA Polymerase (AmpliQ DNA Polymerase, Roche Molecular Systems). DNA was added in a volume of 3 µl, containing about 1–5 ng of template. Amplifications involved an initial incubation for 5 min at 94 °C, 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C, and 3 min at 72 °C; and a final extension for 10 min at 72 °C.

PCR products were sequenced using the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI) and an Applied Biosystem ABI 310 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) automated sequencer. The sequences obtained (about 1453 nt) were compared to those available in the GenBank database (National Center for Biotechnology Information) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) algorithm to identify known sequences with high similarity. The selected sequences were aligned with CLUSTAL X (Thompson et al., 1997).

The bacteria isolated and identified from the PE samples were *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, and *Bacillus subtilis*. A mixture of the three identified bacterial strains, noted herein as MIX, were used for the biodegradation studies. Also, a strain of *Brevibacillus borstelensis* (DSM-No 6347) obtained from the German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) was used in this study due to the interesting results on polyethylene biodegradation published by Hadad et al. (2005).

2.3. Film photo-degradation procedure

The accelerated photo-degradation of the film samples was carried out in previous work (Pablos et al., 2010) using ATLAS/SUNTEST XLS equipment provided with a 2500-W Xenon lamp and a solar filter (borosilicate). Incident energy was fixed using an

International Light IL-700 radiometer (photodiode IL-PT 171C) at 550 W/m^2 in the interval 300–800 nm. The photo-degraded samples studied in this work were polyethylenes exposed to irradiation for 500 h. The temperature was maintained at $45 \text{ }^\circ\text{C}$ during the ageing treatment.

2.4. GPC analysis

Molecular weight was measured by gel permeation chromatography (GPC) on a Polymer Laboratories PL-GPC 220 apparatus with a differential refractive index detector. The mobile phase was 1,2,4-trichlorobenzene to which 2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) antioxidant (0.015%) was added. The analytical flow rate was 1 ml min^{-1} and the temperature was $160 \text{ }^\circ\text{C}$. The values obtained were referenced to a universal curve with the following viscometric parameters: $K = 3.95 \times 10^{-4}$ and $\alpha = 0.726$ (polyethylene).

2.5. Attenuated total reflectance/FT-infrared spectroscopy (ATR–FTIR)

Due to the small size of film samples used in this work the IR spectra were obtained using a Perkin Elmer BX-FTIR spectrometer coupled with an attenuated total reflectance (ATR) accessory, MIRacle™ ATR from PIKE Technologies, and interferograms were obtained from 32 scans. Before the actual analysis, background spectra were obtained without samples in the chamber. The extent of oxidation was determined by measuring the levels of ketone carbonyl (1714 cm^{-1}) absorbances (Reddy et al., 2008). The carbonyl index (CI), defined as the ratio of carbonyl to methylene absorbances, was used to express the concentration levels of carbonyl compounds measured by ATR–FTIR. The CI was calculated according to the baseline method (Culmine et al., 2003) as the ratio of the optical density of the carbonyl absorption band at 1714 cm^{-1} , and the optical density of the methylene absorption band at 1462 cm^{-1} (CH_2 scissoring peak) taken as internal thickness band.

2.6. Contact angle measurements

Wettability of each polyethylene film surface subject to degradation and bacterial biofilm formation were determined by sessile drop measurements of the advancing water contact angle (θ) using a CAM 200 from KSV Instruments. Film samples, previously rinsed with water and dried (4 hat $37 \text{ }^\circ\text{C}$), were supported on glass slides; the wetting liquid was Millipore grade distilled water. The measurements were made at $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Advanced contact angles were measured by a minimum of five independent measurements at appropriate times and are presented as mean \pm standard deviation. The water adhesion tension (τ) was calculated by the equation:

$$\tau = \gamma \cos \theta \quad [1]$$

where θ is the measured water contact angle and $\gamma = 72.8 \text{ dyn cm}^{-1}$ for water.

2.7. Ultrasonication-solvent extraction and GC–MS analysis

The extraction of degradation products resulting from the photo- and biodegradation of polyethylene film samples (both in the presence and absence of pro-oxidant) was performed following the procedure described in the literature (Roy et al., 2008). Hence, identification of the degradation products extracted from polyethylenes was undertaken by gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) with an Agilent Technologies 6890 N chromatograph coupled to a 5973 inert mass spectrometer using

helium as the carrier gas, and equipped with an HP-5MS capillary column. The oven temperature was programmed from $80 \text{ }^\circ\text{C}$ to $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ($5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), and maintained for 30 min. After that, samples were injected at $250 \text{ }^\circ\text{C}$. The degradation products were identified by comparing their mass spectrum with the one from the NST database and checked by comparison of the retention times with that of naphthalene as reference sample. For that purpose, the extraction of degradation products from polyethylene samples was performed using 5 mg of sample, cut into small pieces, mixed with 10 ml chloroform in a 20-ml glass vial, and ultrasonicated in a Branson 2210 apparatus for 2 h in a hot water bath held at $60 \text{ }^\circ\text{C}$. The extract obtained was concentrated by total evaporation of solvent at room temperature. Afterward, 2 ml of chloroform and 20 μl of stock chloroform-solution of naphthalene (1 g l^{-1}) as internal standard were added. The extract was filtered through a 0.2-mm filter prior to analysis by GC–MS.

2.8. Chemiluminescence

Chemiluminescence emissions of film samples were obtained using a CL400 ChemiLUME apparatus from Atlas Electric Devices Co. The polyethylene films (3-mm diameter) were held in aluminium pans, and dynamic tests were performed heating the samples up to $250 \text{ }^\circ\text{C}$ with a heating rate ($5 \text{ }^\circ\text{C/min}$) under a constant flow (50 ml min^{-1}) of dry nitrogen gas.

2.9. Bioassay procedure and indirect impedance technique

Aerobic biodegradation of polyethylene film samples by bacteria were conducted at 30 and $45 \text{ }^\circ\text{C}$ in bioreactors of 7-ml of capacity filled with 1 g of sterile silica and 1.5 ml of bacterial suspension in minimal growth medium (MGM) of 2.5×10^7 cells/ml concentration, prepared as described in Abrusci et al. (2004). The composition of MGM used in this work was: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 8 g; K_2HPO_4 , 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; NaSO_4 , 0.5 g; $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; CaCl_2 , 0.05 g; distilled water, 1000 ml. Suspensions of each bacterium for inocula were prepared previously (Abrusci et al., 2004) fixing an absorbance of 0.05 at 550 nm in saline buffer (0.9 g/l) and in the case of the mixture of *Bacillus*, MIX, equal parts of each suspension were mixed to have the same proportion of each bacterium in the overall population. After that, 10 discs of film samples of 4 mm in diameter (5 mg) were added to the medium. These containers were introduced in 20-ml disposable cylindrical cells charged with 1.5 ml of 2 g l^{-1} KOH aqueous solution and provided with four stainless steel electrodes to measure impedance on a Bac-Trac 4300 (SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkerdorf, Austria). The experimental device and procedure have been described by Abrusci et al. (2004). The device monitors the relative change in the initial impedance value of KOH solution which is converted to concentration of carbon dioxide by a calibration curve of impedance variation versus concentration of CO_2 . Under our experimental conditions, in the absence of polyethylene films the media impedance of the KOH solution remained constant, confirming the absence of organic contaminants. The percentage of biodegradation of the sample can be calculated taking in account the theoretical amount of carbon dioxide ($[\text{CO}_2]_{\text{Theor.}}$) of the sample; % biodegradation = $[\text{CO}_2]_t \cdot 100 / [\text{CO}_2]_{\text{Theor.}}$.

3. Results and discussion

3.1. Bacterial identification

Polyethylene films exposed in an agricultural field for 30 days in April 2009 (Torre Pacheco, Murcia, Spain) and contaminated with bacteria were cultured at $45 \text{ }^\circ\text{C}$ with trypticase–soya–agar (TSA),

and the different colonies of bacteria developed at this temperature were isolated. The 45 °C temperature can be considered extreme in the mulching film application and bacteria that are active under these conditions could be more interesting for biodegradation studies.

The cultured bacterial species were identified by means of their 16S rDNA sequence obtained after PCR amplification and sequencing. A total of three bacterial strains were isolated from films exposed to the agricultural field and all of them were found to be Gram-positive rod-like bacteria.

Comparison of the 16S rDNA sequences of the three isolated bacterial strains with the sequences available in GenBank database (National Center for Biotechnology Information) showed that the strains isolated were *Bacillus cereus* (GU269268.1), with a similarity of 100%, *Bacillus megaterium* (GQ927173.1), with a similarity of 99%, and *Bacillus subtilis* (GQ305125.1), with a similarity of 100%.

The three *Bacilli* isolated from PE exposed for 30 days to agricultural soils in Murcia (Spain) were widespread in soil and air, form endospores, and are ubiquitous in nature, commonly found in soil and vegetation. They have the ability to degrade a wide range of substrates (Claus and Berkeley, 1986). The temperature range for growth of a bacterium is generally considered to be a stable character. According to Gibson and Gordon (1974) and Warth (1978), the three-isolated *Bacillus* can grow in the range of 3–50 °C. In a recent work (Watanabe et al., 2009), three *Bacillus* species (*B. circulans*, *B. brevis*, and *B. sphaericus*) were isolated from agricultural soil in Japan, and they were able to biodegrade photo-degraded LDPE.

3.2. Biofilm formation

The most important aspect during the biodegradation of a material is the sustained growth of microorganisms during the entire process (Hadad et al., 2005). The initial grow of microorganisms can be monitored by investigating the biofilm formation on the polymer surface. Biofilm formation was investigated, using contact angle, ESEM, and FTIR spectroscopy. Film samples were collected from the bioassay reactors after one week of exposure to the biotic environment and studied without rinsing with water. ESEM micrographs clearly indicate that in all the materials studied in this work, bacteria have only colonized in an early stage biofilm the abiotically photo-oxidized films in contrast with their corresponding unaged films on which biofilms were not developed. A similar result has also been reported for oxo-biodegradable polymers (Reddy et al., 2009; Chiellini et al., 2003; Bonhomme et al., 2003). ESEM micrographs of photo-aged LLDPE-Ca samples are shown in Fig. 1a and b, for the biofilm formation of the mixture of bacteria used in this work (MIX) and *B. borstelensis*, respectively.

The existence of biofilm on oxidized polyethylenes was confirmed further by the ATR-FTIR spectra. To illustrate the observed changes on the FTIR spectra of the films due to biofilm

formation, Fig. 2 shows the spectra of photo-degraded LLDPE exposed to the bacterial culture for 7 days.

The bands at 1643 cm⁻¹ and 1550 cm⁻¹ are typical of amide I and II bands, respectively, and together with the broad band in the 3300–3100 cm⁻¹ region of NH-amide absorptions, can be assigned to the presence of a significant amount of protein material on the polymer surface. The broad bands peaking at 1133 and 993 cm⁻¹ show the presence of polysaccharides, the usual copolymers produced by microorganisms, which are the major constituents of the biofilm (Linos et al., 2000; Maquelin et al., 2002; Reddy et al., 2009). Bands that are similar but differing in intensity are observed on biofilms produced by MIX and *B. borstelensis*.

The contact-angle measurements carried out on the films indicate the presence of biofilms and how the polyethylenes change in terms of hydrophilicity or hydrophobicity and thus changes in wettability of the surface, on exposure to a bacterial culture. The contact angle and values obtained for the LLDPE films are compiled in Table 2.

The contact angle of the original LLDPE films was 99.1° and decreased to 90.8° after photo-oxidation. The biotic treatment of this photo-degraded LLDPE noticeably decreased the contact-angle values to 76.2° and 72.2° by the action of *B. borstelensis* and MIX, respectively. Also, LLDPE samples containing pro-oxidants show a drastic decrease in the contact angles after bacterial treatments. This lowering of the contact angle on LLDPE, containing calcium and iron stearates, is an indication of the increase in the hydrophilicity of the polymer surface due to biofilm formation. There was, however, no such decrease in the contact angles of the original LLDPE after biotic treatments and those used as control samples. This difference in biotically degraded film with respect to the photo-degraded materials can be seen more clearly by means of water adhesion tension, the biotic environment increase in the values from 0.1 to 17.4–32.0 dyn/cm being higher (Table 2) in the case of MIX biodegradation. Other authors (Xu and Siedlecki, 2007) working on protein-coated LDPE surfaces have observed similar effects on wettability and increase of water adhesion tension.

This higher water adhesion tension of MIX-biofilm is in agreement with the higher intensity of the FTIR bands for the biofilm produced by the mixture of *Bacillus* with respect to the case of *B. borstelensis*. The presence of *B. subtilis* in the mixture can increase the biofilm formation. In recent years, *Bacillus subtilis* has become a model organism for the study of biofilm formation (Branda et al., 2001; Hamon and Lazizzera, 2001). It has been shown that wild strains of *B. subtilis* generally form more robust floating biofilms than strains derived from the domesticated laboratory strains.

3.3. Evaluation of biodegradation by chemiluminescence, ATR-FTIR, and GC-MS product analysis

Photo-degradation induces oxidation of polyethylene films and the presence of pro-oxidants increases the formation of oxidation

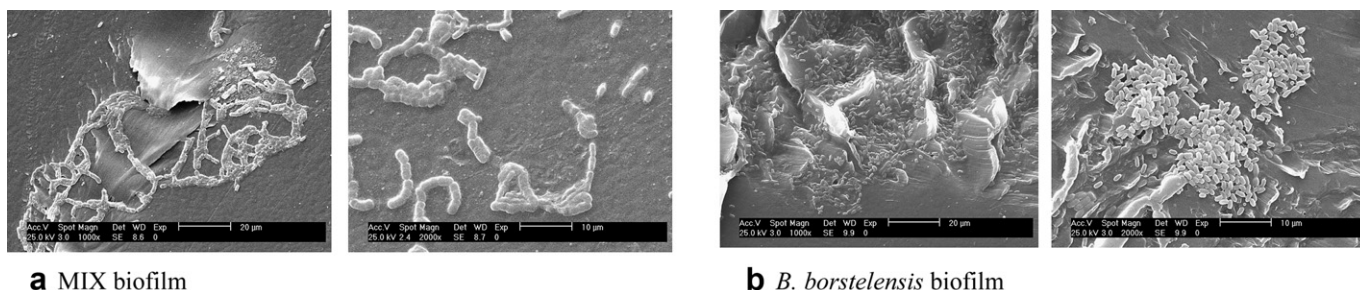


Fig. 1. ESEM images of biofilms developed after 7 days of bacterial treatment in photo-degraded LLDPE-Ca (Left 1000×, Right, 2000×). (a) MIX biofilm (b) *B. borstelensis* biofilm.

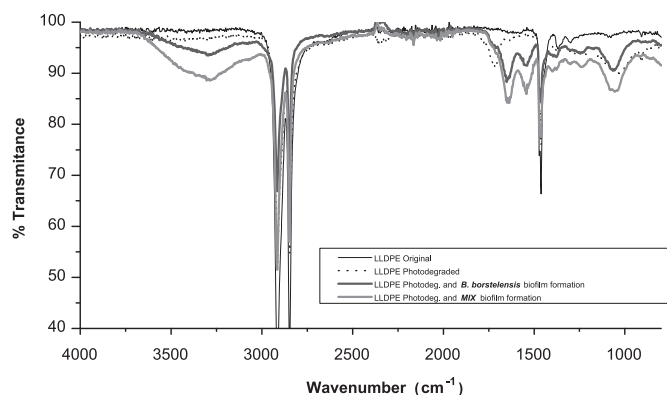


Fig. 2. ATR-FTIR spectra of LLDPE film: original, photo-degraded 500 h under Xe-Lamp and photo-degraded film after bacterial treatment.

products. In an earlier work (Pablos et al., 2010), LDPE exhibited higher photo-degradation with respect to the LLDPE sample, as a consequence of the incorporation of an α -olefin and the increased branching degree of LDPE. Photo-degradation of polyethylenes containing calcium and iron stearates was significant, and a much greater decrease in molecular weight was determined by GPC (Table 1). The results confirmed the more efficient development of degradation processes for polyethylenes with iron stearate in comparison to pure or calcium-stearate doped polyethylenes.

In earlier works, chemiluminescence emissions measured on polymer films were able to quantify the oxidation produced by microorganisms in the structure of gelatine (Abrusci et al., 2007a) and cellulose triacetate (Abrusci et al., 2009) due to their metabolism. The measurement of chemiluminescence under an inert gas gives information on the intrinsic oxidation state of the sample. The CL emission of polyethylene films after 500 h of artificial photo-ageing and after 90 days of bacterial bioassay was studied by temperature-ramping tests under nitrogen. The results are compiled in Table 3.

The onset of the CL emission shifted toward lower temperatures for the biodegraded samples and in general the intensity of the low-temperature peaks increase. In almost all the biodegraded polyethylene films containing calcium and iron stearates two peaks were observed at temperatures lower than 100 °C and their onset temperatures were significantly lower than that measured for the pure polyethylenes. The onset temperatures of CL emission for the samples biodegraded at 45 °C are lower than the onset temperatures measured on samples biodegraded at 30 °C. These results confirm the higher oxidation activity of the microorganisms at 45 °C.

The profile of CL emissions versus temperature in the case of LLDPE photo- and biodegraded films at 45 °C by *B. borstelensis* and the mixture of *Bacillus* (MIX) during 90 days are plotted in Fig. 3.

The effect of pro-oxidants was evidently significant on CL emission. Samples biodegraded at 45 °C, in particular polyethylenes containing calcium and iron stearates, exhibited intense CL peaks at

low temperatures. Such intense emissions at low temperature were also observed on cellulose triacetate cinematographic films and gelatines. Chemiluminescence emission allows the evaluation of the metabolic activity of microorganisms on the polymer surface through oxidation induced by the generation of reactive oxygen species (ROS), such as peroxide radicals, hydroperoxides, hydrogen superoxide, and radical anions.

The carbonyl index (CI) values measured by ATR-FTIR for all the films after 90 days of biodegradation assay are summarized in Table 4.

Incubation of the photo-oxidized polyethylene with *B. borstelensis* and MIX for 90 days showed a marked reduction in the amount of carbonyl residues estimated in terms of carbonyl index. The percentages of CI decrease (in Table 4 between brackets) are higher when the biodegradation was carried out at 45 °C and in particular on higher photo-degraded films containing calcium and iron stearates. The metabolic action at 45 °C of *B. borstelensis* and MIX reduced the carbonyl index by 75–85% in the PE films containing iron stearate and by 31–67% in the case of calcium stearate. These results confirm the higher metabolic activity on photo-degraded PE and in particular on films containing iron. The decrease in CI of oxidized PE can be attributed to the preferential microbial assimilation of ester/carbonyl compounds formed during abiotic oxidation.

Oxo-biodegradation of PE involves a first step of oxidation followed by a second step of microbial degradation. The biodegradation of polyethylene chains starts with the photo- and thermal oxidation during the first abiotic step to form hydroperoxides and carbonyl species (ketones/esters) that decrease the molecular weight by chain scission reactions. In Table 1 the changes in molecular weight after 500 h of photo-ageing are listed, and these confirm the catalytic effect of calcium and iron stearates on degradation. The low-molecular-weight carbonyl compounds formed during the oxidation undergo a second biotic step with similarities to the biodegradation of paraffins (Albertsson et al., 1987; Hakkarainen and Albertsson, 2004). Microbial degradation decreases the number of carbonyl groups due to the formation of carboxylic acids.

The abiotic treatment in this work involved the exposure of polyethylene films to 300–800 nm radiation for a total duration of 500 h. After this period, under the action of the pro-oxidants, the materials were chemically oxidized and thereby expected to be more susceptible to microbial attack.

To confirm the biodegradation of low-molecular weight products generated in the first abiotic step (Pablos et al., 2010), a quantitative analysis of the degradation products was carried out after solvent extraction by ultrasonication. This extraction technique was selected due to the better reproducibility and effectiveness in respect to other methods (Contat-Rodrigo et al., 2001). The extracted products from film samples—original, photo-degraded (500 h), and after 90 days of biodegradation—were analysed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) for comparison. From the obtained results, two representative GC-MS chromatograms are plotted in Fig. 4.

Table 2

Advancing water contact angles (θ) and water adhesion tension (τ) values determined by sessile drop measurements on LLDPE films.

Film Sample	Original		Photo-degraded		<i>B. borstelensis</i>		MIX	
	θ	τ	θ	τ	θ	τ	θ	τ
LLDPE	99.1° ± 0.7°	0	90.8° ± 1.2°	0	76.2° ± 2.0°	17.4	72.2° ± 3.0°	22.2
LLDPE-Fe	97.3 ± 1.9°	0.1	89.9° ± 4.1°	0.1	74.3° ± 3.0°	19.7	63.9° ± 3.8°	32.0
LLDPE-Ca	97.7° ± 2.1°	0.1	89.9° ± 2.6°	0.1	75.4° ± 2.4°	18.3	70.7° ± 0.6°	24.1

τ in dyn/cm.

Table 3
Chemiluminescence data of Onset Temperature (°C) and peak Intensity (mV) from temperature-ramping curves obtained with polyethylene films under nitrogen.

PE Film	Photo-degradation	<i>B. borstelensis</i> /45 °C			<i>B. borstelensis</i> /30 °C		MIX/45 °C			MIX/30 °C	
		T (°C) Onset	T (°C) Onset	1 st peak I (mV)	2 nd peak I (mV)	T (°C) Onset	peak I (mV)	T (°C) Onset	1 st peak I (mV)	2 nd peak I (mV)	T (°C) Onset
LDPE	106	90	–	–	106	–	90	–	–	106	–
LDPE-Ca	123	37	49 (77 °C)	–	71	186 (185 °C)	38	145 (100 °C)	101 (160 °C)	75	205 (158 °C)
LDPE-Fe	101	40	656 (120 °C)	–	60	–	38	89 (95 °C)	33 (s-160 °C)	89	61 (158 °C)
LLDPE	196	92	–	–	135	–	96	–	–	102	–
LLDPE-Ca	209	40	50 (77 °C)	87 (162 °C)	115	–	53	–	150 (164 °C)	105	114 (s-175 °C)
LLDPE-Fe	110	35	56 (76 °C)	163 (156 °C)	103	29 (165 °C)	45	73 (100 °C)	164 (152 °C)	86	–

- no observed peak, s - shoulder.

Photo-oxidation and biodegradation of polyethylene produced oxidized species of low-molecular weight (Albertsson et al., 1987) and they were eluted and detected as noise in the base line in the initial stages, i.e. < 20 min of the GC experiment. Only in the case of photo-degraded films could a few small peaks be distinguished in the initial stages of the elution and assigned to aliphatic alcohols and acids. These low signals and bad detection of very-low-molecular-weight products could be attributed to the high volatility of the lower alcohols, acids, and ketones, which resulted in their vaporization during the concentration step.

The degradation products extracted and clearly identified from the photo-degraded PE were basically hydrocarbons (saturated and unsaturated) and alcohols of higher molecular weight, as is shown in Fig. 4. The hydrocarbons that were present in relatively high concentrations in photo-degraded LDPE-Fe, were found at a significantly lower concentration in LDPE without Fe-stearate. This fact confirms the more efficient chain scission of the polymer due to the catalytic effect of the pro-oxidant and it is in agreement with the results obtained by other authors (Roy et al., 2008). After the biotic treatment at 45 °C the low-molecular-weight products were almost absent, at the level present in the original polyethylene. This loss of peaks in the chromatograms confirms the utilization of the extractable products in the growth of both *B. borstelensis* and the mixture of *Bacillus* MIX.

Fig. 5 shows the changes in molecular weight distributions and corresponding data for LDPE in the absence and presence of iron stearate after 500 h of irradiation and after biotic treatment.

There is a significant change in molecular weight distribution and in particular in the presence of Fe-stearate. The molecular weight distribution after 90 days of biodegradation by the mixture of *Bacillus* MIX shifts slightly toward the left, indicating a small decrease in average molecular weight a 5.6% in M_w . A similar result

(6% decreases in M_w) was obtained with *B. borstelensis* at 45 °C. The decrease in molecular weight is much lower than that observed by other authors (Hadad et al., 2005) in photo-degraded LDPE/pro-oxidant and using *B. borstelensis* (90 days liquid culture at 50 °C), 34% decrease in M_n . In recent research, Reddy et al. (2009) measured a small increase of the molecular weight in the biotic treatment of an LDPE with 2% of pro-oxidant using *P. aeruginosa* (liquid culture, 40 days at 30 °C), indicating that *P. aeruginosa* was just able to utilize chain-end low-molecular-weight compounds and unable to perturb high-molecular-weight fractions. Our results confirm that bacteria employed in this work biodegrade extractable low-molecular-weight compounds but also molecular weight fraction less than 5000 Da, which is in agreement with the findings of other authors (Chiellini et al., 2003; Kawai et al., 2004). The porosity of the surface produced by the biodegradation of low-molecular-weight fractions can favor swelling and relaxation of the whole material structure and, thus, facilitate diffusion of water and soluble compounds inside, therefore substantially accelerating the biodegradation.

3.4. Carbon dioxide production by indirect impedance technique

As described in the materials and methods section, biodegradation of the photo-degraded polyethylene films was studied by determining the carbon dioxide produced in the metabolic action of the bacteria, using the indirect impedance technique. The results confirm that biodegradation by *B. borstelensis* and MIX at 30 °C was slow and in the range of 0.7–1.2% biodegradation after 90 days of bacterial bioassay. No significant differences were found between both series of bioassays on photo-degraded polyethylenes. These results are in agreement with the estimation that polyethylene

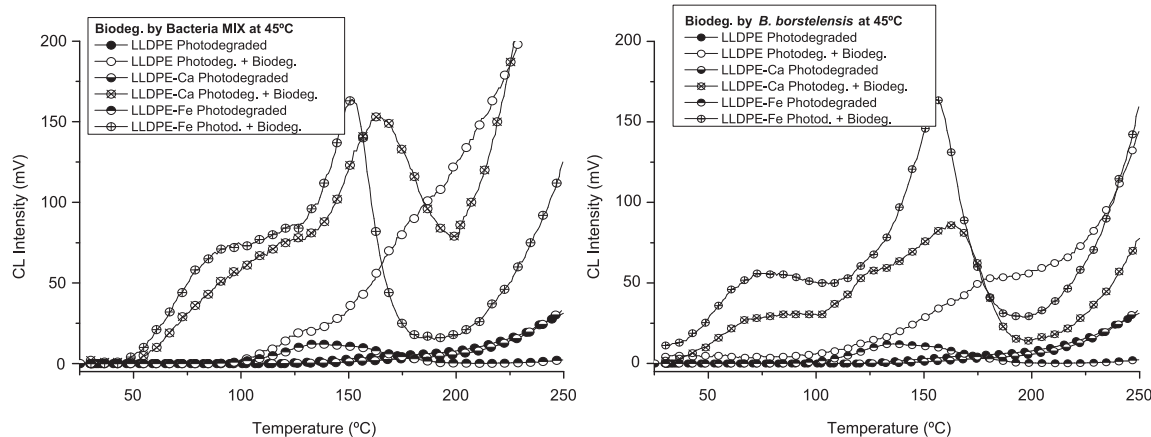


Fig. 3. Chemiluminescence temperature-ramping curves obtained from polyethylene films under nitrogen.

Table 4
Carbonyl Index (C.I.) values determined by ATR-FTIR from polyethylene films.

PE	Original	Photo-degradation	<i>B. borstelensis</i>		MIX	
			30°C (Δ%)	45°C (Δ%)	30°C (Δ%)	45°C (Δ%)
LDPE	0.041	0.142	0.133 (–6)	0.124 (–12)	0.139 (–2)	0.102 (–28)
LDPE-Ca	0.034	0.424	0.397 (–6)	0.291 (–31)	0.406 (–4)	0.262 (–38)
LDPE-Fe	0.034	0.467	0.134 (–71)	0.098 (–79)	0.217 (–53)	0.075 (–85)
LLDPE	0.036	0.234	0.126 (–46)	0.095 (–59)	0.127 (–46)	0.095 (–59)
LLDPE-Ca	0.061	0.147	0.086 (–41)	0.048 (–67)	0.102 (–30)	0.085 (–42)
LLDPE-Fe	0.046	0.309	0.104 (–66)	0.046 (–85)	0.150 (–51)	0.076 (–75)

(Δ%) – difference between C.I. of PE photo-degraded and C.I. after 90 days of biodegradation in percentage.

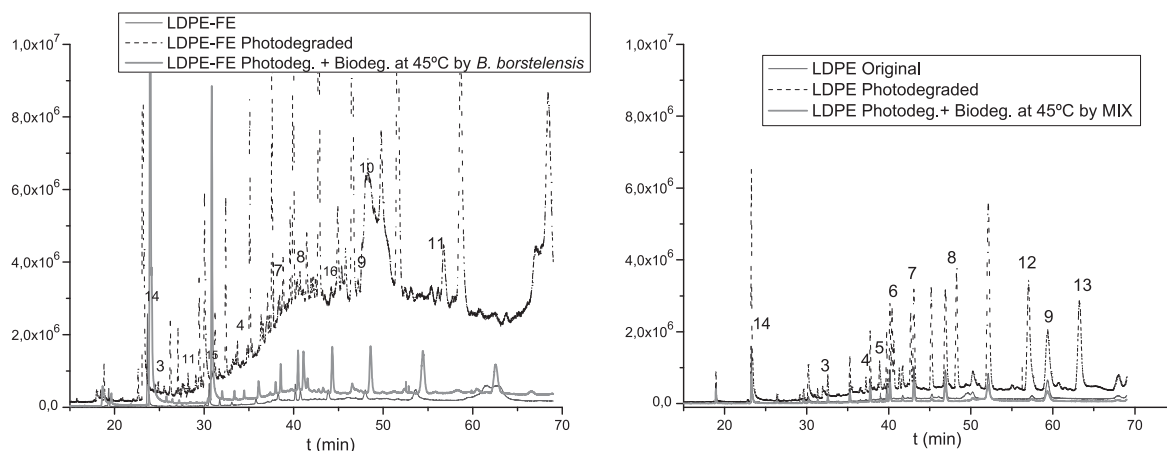


Fig. 4. GC–MS chromatograms of the products extracted from initial, photo-degraded and biodegraded samples. A) LDPE-Fe and B) LLDPE materials biodegraded at 45 °C respectively by *B. borstelensis* and mixture of *Bacillus* (MIX). Different products were identified: (1) Hexadecane, (2) Heptadecane, (3) Octadecane, (4) Tetracosane, (5) Hexacosane, (6) Heptacosane, (7) Eicosane, (8) Docosane, (9) Octacosane, (10) Nonacosane, (11) Tricontane, (12) Hexatricosane, (13) Dotriacontane, (14) Tetradecanol, (15) Hexadecanol, (16) 1-Hexacosene.

biodegrades about 1% if pre-exposed to sunlight for two years (Albertsson and Karlsson, 1988).

In contrast, the results obtained on the biodegradation experiments carried out at 45 °C on carbon dioxide generation on the mineralization process for different polyethylene films showed significant differences. The time courses of carbon mineralization at 45 °C of the various photo-degraded polyethylene films are

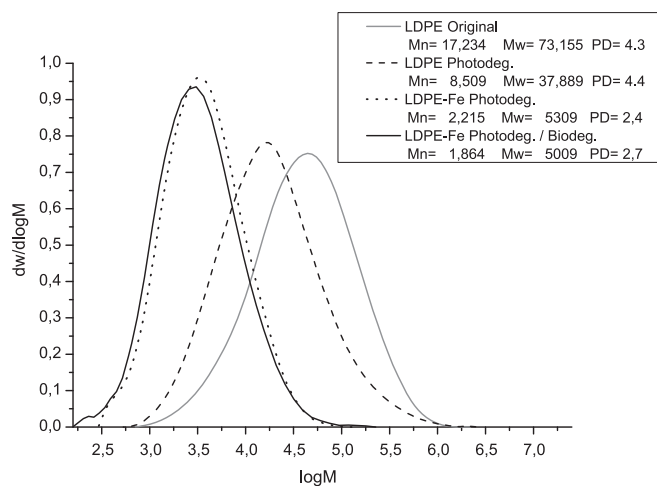


Fig. 5. Molecular weight distribution curves of LDPE original and photo-degraded 500 h together with LDPE-Fe photo-degraded 500 h and after 90 days of biodegradation at 45 °C by the mixture of *Bacillus* MIX.

reported in Fig. 6A and B for the mixture of *Bacillus* (MIX) and *B. borstelensis*, respectively.

From the results plotted in Fig. 6, biodegradation of photo-degraded polyethylene films started in the first week found the production of CO₂ to be faster in the case of *B. borstelensis* and in particular when Ca and Fe stearates are present in the formulation. Biodegradation by MIX (Fig. 6A) exhibited a pronounced difference between the pure polyethylenes (2–2.5% biodegradation after 90 days) and the corresponding materials containing pro-oxidants (7–10% biodegradation after 90 days). In the biodegradation experiments using *B. borstelensis* the order on biodegradation effectiveness after 90 days was, as shown in Fig. 6B: LDPE, LLDPE < LLDPE-Ca < LLDPE-Fe < LDPE-Ca, LDPE-Fe. The higher value of biodegradation was obtained by *B. borstelensis* in the LDPE materials containing Ca and Fe stearates, 11.5% after 90 days at 45 °C. These values are lower than that measured by Hadad et al. (2005), who reported a maximal biodegradation of 17% and 34% reduction in gravimetric and molecular (Mn) weights, respectively, after irradiation followed by 90 days of incubation with this bacterium at 50 °C.

The percentage of biodegradation reached is higher in the materials containing Ca and Fe stearates than in the pure polyethylenes, and, in particular, in the more branched and photo-degraded material LDPE. This result confirms a more efficient biodegradation process on the more oxidized polyethylenes. In the case of *B. borstelensis*, biodegradation is faster than in the case of MIX. The metabolic action of *B. borstelensis* is more efficient in the biodegradation of low-molecular-weight products in the first 60 days.

The effect of higher temperatures on biodegradation has recently been observed by other authors (Fontanella et al., 2010)

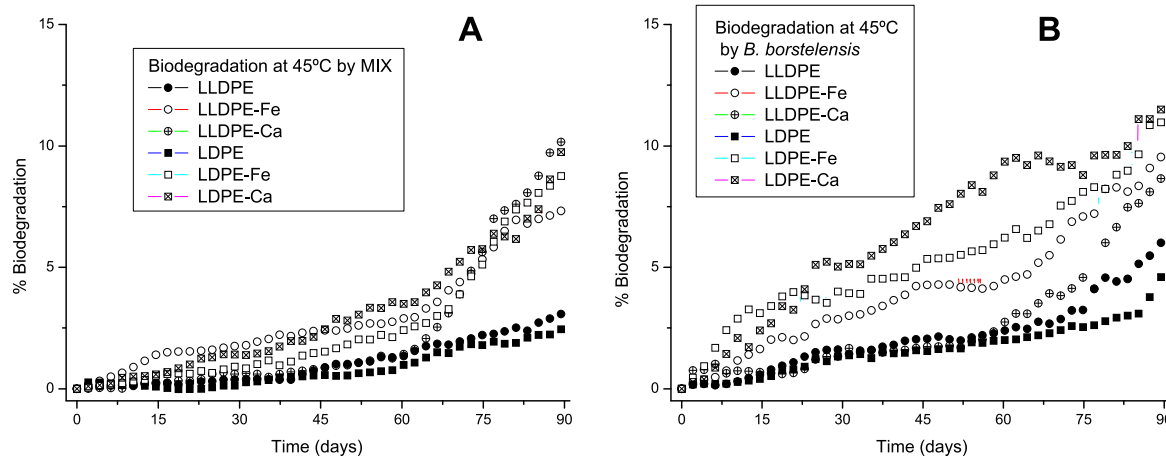


Fig. 6. Percentage of carbon mineralization at 45 °C, determined from carbon dioxide measurements in the biodegradation of polyethylene films by the mixture of *Bacillus*, MIX, (A) and *B. borstelensis* (B).

studying biodegradation of photo-degraded polyethylenes containing pro-oxidants by *Rhodococcus rhodochrous*. Experiments performed in compost at 58 °C reached mineralization values of 16% and 24% for LDPE and LLDPE containing pro-oxidant complexes after 317 days. In contrast, incubation with *R. rhodochrous* at 25 °C in soil yielded mineralization values of 9 and 12% for LDPE and LLDPE after 352 days.

Our results obtained in 90 days of incubation at 30 and 45 °C are in agreement with the reported data and confirm the important effect of temperature from an applied point of view. The percentages of mineralization reported here show that the mixture of *Bacillus* and the bacterium *B. borstelensis* was able to remain metabolically active for 90 days using photo-degraded polyethylenes as the sole carbon source. The nature of polyethylene in branching is important but the presence of metals and the extent of abiotic degradation of the materials will be crucial to allow a second step in the biodegradation process. Even though for efficient biodegradation the key factor will be the selection of the microorganisms and also the control of the bioassay conditions. From our point of view, to biodegrade oxidized polyethylenes attention should be focused on the selection of microorganisms for an effective composting processes.

4. Conclusions

Bacteria adhering to polyethylene films buried in soil (located in Murcia, Spain) and cultured in the laboratory at 45 °C were isolated for identification. Strain characterization was carried out with a combination of culture-dependent methods and sequencing of part of the 16S ribosomal RNA gene (rDNA) after amplification by a polymerase chain reaction. Only three bacterial species common in soil were found attached to the polymer; they were identified as *B. cereus*, *B. megaterium*, and *B. subtilis*. Biofilm formation was developed only in the photo-degraded materials after one week of bacterial treatment.

The data obtained by different techniques (chemiluminescence, ATR–FTIR, and GC/MS product analysis) confirmed a more efficient biodegradation of polyethylene films on the bioassays carried out at higher temperature (45 °C).

The CL emissions due to decomposition of oxidation species take place at lower temperatures, confirming the oxidative effect of the microorganisms on the biodegraded polyethylene film. Incubation of the photo-oxidized polyethylene with MIX and *B. borstelensis* for 90 days showed a marked reduction in the amount of carbonyl

residues. The percentages of CI decrease were higher when the biodegradation was carried out at 45 °C and in particular on higher photo-degraded films containing Ca and Fe stearates. The metabolic action of bacteria at 45 °C reduced the carbonyl index by 75–85% in the PE films containing Fe stearate and by 31–67% in the case of Ca stearate. The disappearance of photo-generated low-molecular products with biodegradation, were more efficient on the biodegraded films at 45 °C.

Carbon dioxide measurements using the indirect impedance technique showed that biodegradation by bacteria at 30 °C was very slow and in the range of 0.7–1.2% of mineralization after 90 days. By contrast, at 45 °C biodegradation was more efficient and, in particular, in the photo-degraded materials containing Ca and Fe stearates, percentages of biodegradation were 11.5% with *B. borstelensis* and 7–10% with the mixture of *Bacillus* (MIX).

Photo-degradation increases the rate of biodegradation of the polyethylene films by the bacteria studied in this work. Hence the use of a pro-oxidant in the polyethylene formulations could be an interesting way to prepare more efficient biodegradable materials.

Acknowledgments

The authors would like to thank the “MICINN (Spain) for financial support (MAT2009-09671) and UAM–CAM Ref. CCG10-UAM/AMB-5411. One of the authors, C.A., would also like to thank the Ramón y Cajal program.

References

- Abrusci, C., Martín-González, A., Del Amo, A., Corrales, T., Catalina, F., 2004a. Biodegradation of type-B gelatines by bacteria isolation from cinematographic films. A viscometric study. *Polymer Degradation Stability* 86, 283–291.
- Abrusci, C., Martín-González, A., Del Amo, A., Catalina, F., Bosch, P., Corrales, T., 2004b. Chemiluminescence study of commercial type-B gelatines. *Journal Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 163, 535–546.
- Abrusci, C., Marquina, D., Santos, A., Del Amo, A., Corrales, T., Catalina, F., 2007a. A chemiluminescence study on degradation of gelatine. Biodegradation by bacteria and fungi isolated from cinematographic films. *Journal Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 185, 188–197.
- Abrusci, C., Marquina, D., Del Amo, A., Catalina, F., 2007b. Biodegradation of cinematographic gelatin emulsion by bacteria and filamentous fungi using indirect impedance technique. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60, 137–143.
- Abrusci, C., Marquina, D., Santos, A., Del Amo, A., Corrales, T., Catalina, F., 2009. Biodeterioration of cinematographic cellulose triacetate by *Sphingomonas paucimobilis* using indirect impedance and chemiluminescence techniques. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 759–764.

- Albertsson, A.-C., Karlsson, S., 1988. The three stages in the degradation of polymers – polyethylene as a model substance. *Journal of Applied Polymer Science* 35, 1289–1302.
- Albertsson, A.-C., Karlsson, S., 1990. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. *Progress in Polymer Science* 15, 177–192.
- Albertsson, A.-C., Andersson, S.O., Karlsson, S., 1987. The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* 18, 73–87.
- Albertsson, A.-C., Barenstedt, C., Karlsson, S., 1993. Increased biodegradation of a low-density polyethylene (LDPE) matrix in starch-filled LDPE materials. *Journal of Environmental Polymer Degradation* 1, 241–245.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.M., Lemaire, J., Sancelme, M., Scott, G., 2003. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* 81, 441–452.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R., 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 11621–11626.
- Chiellini, E., Corti, A., Swift, G., 2003. Biodegradation of thermally-oxidized, fragmented low-density polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability* 81, 341–351.
- Chiellini, E., Corti, A., D'Antone, S., 2007. Oxo-biodegradable full carbon backbone polymers – biodegradation behaviour of thermally oxidized polyethylene in an aqueous medium. *Polymer Degradation and Stability* 92, 1378–1383.
- Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. The genus *Bacillus*. In: Sneath, P.H.A., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1105–1139.
- Contat-Rodrigo, L., Haider, N., Ribes-Greus, A., Karlsson, S., 2001. Ultrasonication and microwave extraction of degradation products from degradable polyolefin blends aged in soil. *Journal of Polymer Science* 79, 1101–1112.
- Culmine, J.V., Janissek, P.R., Heise, H.M., Akcelrud, L., 2003. Degradation profile of polyethylene after artificial accelerated weathering. *Polymer Degradation and Stability* 79, 385–397.
- Fontanella, S., Bonhomme, S., Koutny, M., Husarova, L., Brusson, J.-M., Courdavault, J.-P., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G., Lemaire, J., Delort, A.-M., 2010. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability*. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.009.
- Gibson, T., Gordon, R.E., 1974. *Bacillus*. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 529–555.
- Hadad, D., Geresh, S., Sivan, A., 2005. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1093–1100.
- Hakkarainen, M., Albertsson, A.-C., 2004. Environmental degradation of polyethylene. *Advances in Polymer Science* 169, 177–199.
- Hamon, M.A., Lazizzera, B.A., 2001. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 42, 1199–1209.
- Jakubowicz, I., 2003. Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE). *Polymer Degradation and Stability* 80, 39–43.
- Kawai, F., Watanabe, M., Shibata, M., Yokoyama, S., Sudate, Y., Hayashi, S., 2004. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi. *Polymer Degradation and Stability* 86, 105–114.
- Linos, A., Berekaa, M.M., Reichelt, R., Keller, U., Schmitt, J., Flemming, H.C., Kroppenstedt, R.M., Steinbuechel, A., 2000. Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by distinct *actinomycetes*: microbial strategies and detailed surface analysis. *Applied Environmental Microbiology* 66, 1639–1645.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endtz, H., Naumann, D., Puppels, G.J., 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 51, 255–271.
- Otake, Y., Kobayashi, T., Ashabe, H., Murakami, N., Ono, K., 1995. Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl-chloride, and urea-formaldehyde resin buried in soil for over 32 years. *Journal of Applied Polymer Science* 56, 1789–1796.
- Pablos, J.L., Abrusci, C., Marín, I., López-Marín, J., Catalina, F., Espí, E., Corrales, T., 2010. Photodegradation of polyethylenes: comparative effect of Fe and Ca-stearates as pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability* 95, 2057–2064.
- Reddy, M.M., Gupta, R.K., Bhattacharya, S.N., Parthasarathy, R., 2008. Abiotic oxidation studies of oxo-biodegradable polyethylene. *Journal of Polymers and the Environment* 16, 27–34.
- Reddy, M.M., Deighton, M., Gupta, R.K., Bhattacharya, S.N., Parthasarathy, R., 2009. Biodegradation of oxo-biodegradable polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science* 111, 1426–1432.
- Roy, P.K., Titus, S., Surekha, P., Tuls, E., Deshmukh, C., Rajagopal, C., 2008. Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability* 93, 1917–1922.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- Warth, A.D., 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* 134, 699–705.
- Watanabe, T., Ohtake, Y., Asabe, H., Murakami, N., Furukawa, M., 2009. Biodegradability and degrading microbes of low-density polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science* 111, 551–559.
- Xu, L.-Ch., Siedlecki, Ch.A., 2007. Effect of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28, 3273–3283.

Photodegradation and Biodegradation by Bacteria of Mulching Films Based on Ethylene-Vinyl Acetate Copolymer: Effect of Pro-Oxidant Additives

C. Abrusci,¹ J. L. Pablos,² I. Marín,¹ E. Espí,³ T. Corrales,² F. Catalina²

¹Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid-UAM, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain

²Polymer Photochemistry Group, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, C.S.I.C., Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain

³Repsol, Ctra. A-5, Km. 18, 28931-Móstoles, Madrid, Spain

Received 20 September 2011; accepted 10 February 2012

DOI 10.1002/app.36989

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

ABSTRACT: The photodegradation (432 h under irradiation of Xe-Lamp-solar filter) of an ethylene vinyl acetate (EVA) copolymer with vinyl acetate content of 9% was studied, and the effect of iron and calcium stearates was evaluated using different techniques such as attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), gel permeation chromatography (GPC), and thermal analysis methods (DSC and TGA). A re-arrangement in crystallization and consequent decrease in thermal stability were found through differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA), which were in agreement with the chain scission tendency. The presence of Ca and Fe pro-oxidants additives in EVA films increased the ketone carbonyl formation and decreased the ester absorption band of the acetate respect to the pure EVA, as it was evidenced by the significant changes in Carbonyl Indexes found by FTIR. The activity of stearates has been also evaluated by chemiluminescence, where the temperature-ramping tests under nitrogen showed the formation of a peroxide peak at lower temperature. The lower stability of the films containing pro-oxidants was evidenced by the values of oxidation induction time (OIT) determined by DSC. The results were supported by GC-MS, where the concentration of extracted products identified in the EVA containing pro-oxidants was significant and a much greater decrease in molecular weight was determined by GPC, which confirmed the development of degradation for EVA

with Ca and Fe stearates in comparison to pure EVA. Biodegradation of photodegraded EVA films were studied at 45°C during 90 days using a mixture of *Bacillus* (MIX) (*B. cereus*, *B. megaterium*, and *B. subtilis*) and, in parallel, by *Brevibacillus borstelensis* as reference strain. Biodegradation of EVA-films was studied by Chemiluminescence, ATR-FTIR and GC-product analysis and the data confirm more efficient biodegradation on the materials containing pro-oxidants. The chemiluminescence emissions due to decomposition of oxidation species was observed at lower temperatures on the biodegraded samples. Also, the drastic decrease of carbonyl index and the disappearance of photo-generated low molecular products with biodegradation were more efficient on the biodegraded films containing pro-oxidants. EVA mineralization was evaluated by carbon dioxide measurement using indirect impedance technique. Biodegradation by *B. borstelensis* and MIX at 45°C was similar and exhibited a pronounced difference between the pure photodegraded EVA film (around 15% of mineralization) and the corresponding photodegraded films containing Ca and Fe stearates where biodegradation extent reached values of 23-26% of biodegradation after 90 days. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 000: 000–000, 2012

Key words: ethylene-vinyl acetate copolymer (EVA); photodegradation; biodegradation; bacteria; pro-oxidants; agriculture

INTRODUCTION

Nowadays, polyethylene and its copolymers such as ethylene-vinyl acetate are the preferred materials in the application of agricultural films. The advantages of ethylene vinyl acetate copolymers¹ (EVA) against polyethylene as base polymer for agricultural films

are determined by two intrinsic characteristics: its greater polarity and less crystallinity. The higher polarity of EVA results in more compatibility with the majority of organic additives than low density polyethylene (LDPE), which makes it have a better dispersion in the polymeric matrix, a slower migration and a higher maximum concentration. Because of this, film quality improves and a longer duration of an anti-drip effect is achieved. In test carried out in Florida (USA) and Almeria (Spain) or artificial ageing (xenon lamp Atlas Ci4000) it has been demonstrated that the photostability increases with the vinyl acetate (VAc) content. Due to its outdoor stability, the photodegradation of EVA and long-term deterioration during its service life have been

Correspondence to: F. Catalina (fcatalina@ictp.csic.es).

Contract grant sponsor: MICINN; contract grant number: MAT2009-09671.

Contract grant sponsor: UAM-CAM; contract grant number: CCG10-UAM/AMB-5411.

studied for others applications² such as, cell encapsulant^{3,4} and toy industry⁵ but also in blends with PVC⁶ and PE,⁷ in EVA composites with inorganic fillers such as clay,⁸ carbon black⁹ and carbon nanotubes.¹⁰ Recently, a detailed study of the VAc content effect on UV-ageing was published¹¹ using EVA containing 14% and 18% of VAc.

In the EVA agricultural application,¹ the opaque effect to infrared radiation (thermicity) is increased. Acetate functionalities have absorption bands in the IR region between 7-14 microns of wavelength and the EVA copolymers with high contents of VAc can be considered thermal- or heat- insulators (according to the UNE-EN regulation 13206). The presence of acetoxy groups in the ethylene prevents adjacent PE chains packing into a crystal lattice; therefore EVA with a VAc content higher than 30% w/w is sensibly amorphous. The less crystalline character of the EVA copolymers improves visible light transmission, reduces turbidness and improves mechanical properties such as impact and tear. Due to these advantages, for some years now, EVA copolymers have shifted polyethylene in agricultural film applications. EVA copolymers with a randomly content of VAc lower than 18% are used as monolayer films since higher contents increase polarity to allow adhesion of powder to the film surface diminishing the necessary transparency for plant growth.

In this paper, we have studied the photodegradation of an EVA copolymer with a content of 9% in vinyl acetate, due to the interest of this grade in agricultural mulching film. Also we have evaluated the effect of calcium and iron stearates as additives on the degradation process. The degradation of these materials has been compared with earlier results obtained with polyethylene¹² using these pro-oxidant additives. Attenuated total reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), gel permeation chromatography (GPC), and thermogravimetric analysis (TGA) were used to evaluate the degree of photodegradation of the materials and the effect of the stearates as pro-oxidants.

Chemiluminescence (CL) has been used to study oxidation of the EVA films, due to its offered advantages with respect to many conventional techniques.¹³ Chemiluminescence from polymers is due to the recombination of secondary alkyl peroxy radicals, which promotes ketone products to its lowest triplet state and the radiative deactivation gives the light emission in the visible region.¹⁴ The chemiluminescence emission can be related to the hydroperoxide (POOH) content, since generation of peroxy radicals depends on the peroxide concentration formed during processing or in-service life of the material under ambient conditions.¹⁵ Hence, the activity of calcium and iron stearates has been also

evaluated by chemiluminescence measurements of EVA-films at different ageing times, and the results were confirmed by analysis of the molecular weight changes and carbonyl index measurements.

After photodegradation, mulching film fragments are difficult to collect from the soil since erosion by wind and rain contribute to complete the breakdown of the embrittled film into friable powder. The objective of total disappearance of the film fragments from the agricultural fields would imply polyethylene biodegradation, known as "oxo-biodegradation". This mechanism of environmental biodegradation is to promote, first, abiotic (photo or thermo) oxidation, and second, microbial biodegradation. Most of the studies on the biodegradability of polyethylene containing pro-oxidants have been carried out on complex solid media such as soil and compost, but only recent research¹⁶⁻¹⁸ supports the idea that such materials are biodegradable.

Following the objective of evaluation of an oxo-biodegradation mechanism, a bacterial biodegradation study (second step) was carried out on the previously (first step) photodegraded EVA films. Biodegradation tests on discoid fragments of EVA films were performed in silica at 45°C with controlled inocula of the bacteria isolated in a previous work¹⁸ from mulching films exposed in an agricultural field, mixture of *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* (MIX). In parallel experiments biodegradation was also studied using *Brevibacillus borstelensis* as reference strain. Together with a characterization study of the biodegraded samples, two different techniques were used to evaluate biodegradation of EVA films, measurement of the carbon dioxide production or mineralization (process where an organic substance is converted to an inorganic product) by indirect impedance and chemiluminescence emission of biodegraded film samples. Both techniques^{19,20} were previously employed and proved their suitability to study polymer biodegradation. With this study, the presence of a polar monomer, vinyl acetate, in the polyethylene chain has been evaluated in terms of photodegradation and biodegradation.

EXPERIMENTAL

Materials and polymer characterization

Films of 25 microns of thickness prepared by blow moulding extrusion from a commercial grade (PA-530 from Repsol) ethylene-vinyl acetate copolymer (EVA) of 9% of vinyl acetate content (VAc) and EVA films with iron and calcium stearates (EVA-Fe, EVA-Ca) as pro-oxidant additives (at 0.2% w/w) were prepared by Repsol.

Molecular weight was measured by *Gel Permeation Chromatography* (GPC) on a Polymer Laboratories PL-

GPC 220 apparatus with a differential refractive index detector. The mobile phase was 1,2,4-trichlorobenzene to which 2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT) antioxidant (0.015%) was added. The analytical flow rate was 1 mL/min and the temperature was 160°C. The values obtained were referenced to a universal curve with the following viscosimetric parameters $K = 3.95 \times 10^{-4}$ and $\alpha = 0.726$ (polyethylene).

FTIR spectra were obtained using a PERKIN ELMER BX-FTIR spectrometer coupled with an Attenuated Total Reflectance (ATR) accessory, MIRacle™ ATR from PIKE Technologies and interferograms were obtained from 32 scans at a 4 cm^{-1} resolution from 400 to 4000 cm^{-1} . Before the actual analysis, background spectra were obtained without samples in the chamber. EVA degradation was determined by using the standard Carbonyl Index method²¹ (CI), as the ratio of the optical density of the ketone carbonyl absorption band at 1715 cm^{-1} , and the optical density of the in-plane deformation rocking absorption band of methylene at 2850 cm^{-1} taken as internal thickness band ($\text{CI} = A_{1715}/A_{2850}$). Also, CIs referred to other specific bands were calculated such as, ester carbonyl stretching vibration at 1735 cm^{-1} (A_{1735}/A_{2850}), asymmetric and symmetric stretching vibrations (C—O—C) at 1238 and 1175 cm^{-1} respectively (A_{1238}/A_{2850} and A_{1175}/A_{2850}) or lactone carbonyl band at 1780 cm^{-1} (A_{1780}/A_{2850}).

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed on a METTLER DSC823 instrument over the temperature range 30°C to 180°C. The measurements were made at a heating rate of 10°C/min in an inert atmosphere of nitrogen and the instrument was calibrated with an indium standard ($T_m = 429 \text{ K}$, $H_m = 25.75 \text{ J/g}$). To erase the thermal history of the material, first a heating ramp rate at 10°C/min was used, followed by a cooling ramp and a consecutive heating ramp of 10°C/min each. The melting peak (T_m) and the melting enthalpy (ΔH_m) were obtained, and percentages of crystallinity ($\%X_c$) were determined using the reference of 293 J/g for crystalline polyethylene.²² For the Oxidation Induction Time (OIT), a standard method (ASTM 3895-80 and ISO 11357) was used to determine the thermal stability of the initial EVA films prepared in this work. The measurement was made with DSC in the isothermal mode at a constant temperature of 200 °C. The sample was maintained under nitrogen (40 mL/min) until the test temperature was attained, and then a flux of oxygen (40 mL/min) was supplied. The latter was taken as time zero. The OIT value is the time needed to reach the onset of oxidation, detected as the start of an exotherm, and can be correlated with the stability of the material.

Thermogravimetric analysis

The TGA experiments have been carried out in a TGA Q-500 (Perkin-Elmer). The heating rate for the

dynamic conditions was 10°C/min, and the nitrogen flow was maintained constant at 60 mL/min.

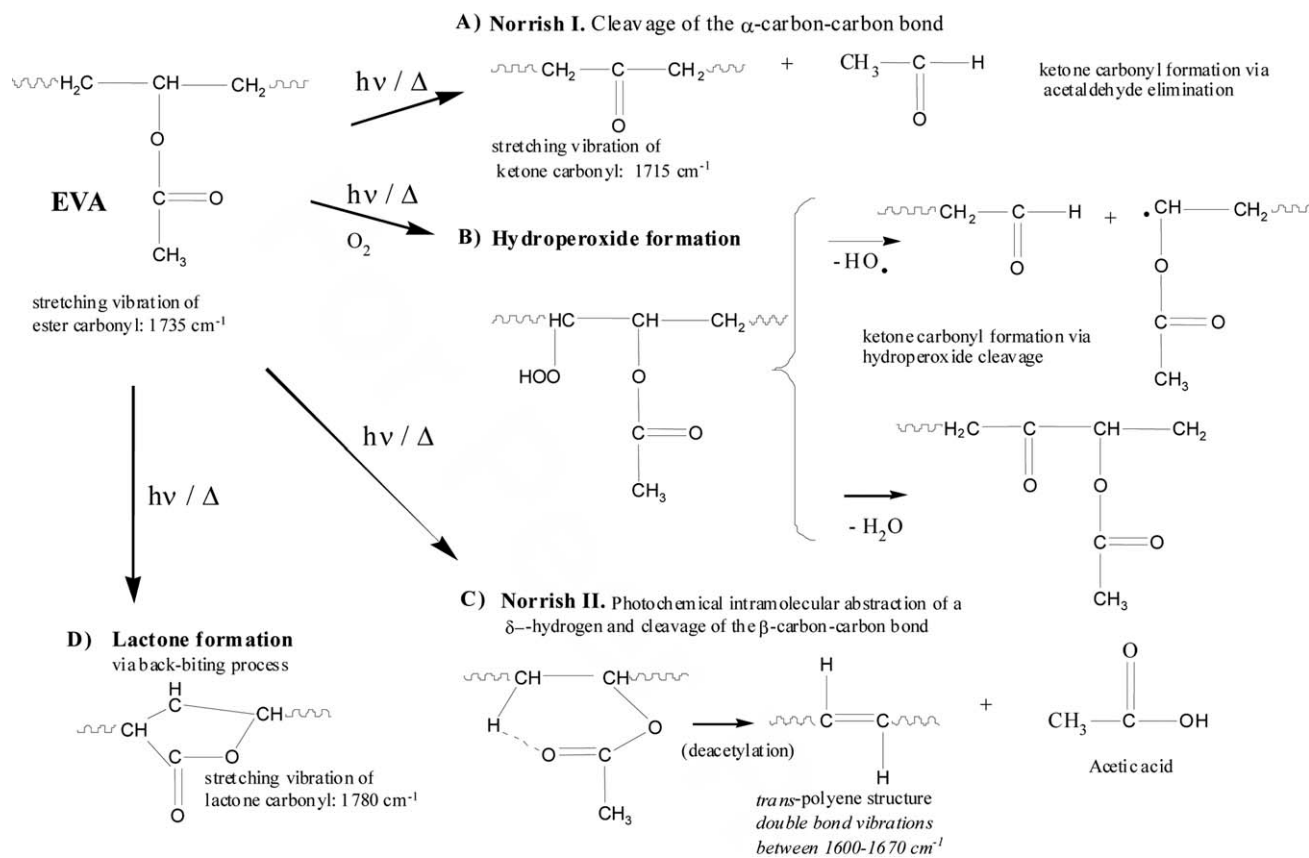
Identification of the degradation products extracted from EVA was undertaken by Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) with a Agilent Technologies 6890 N chromatograph coupled to a 5973 inert mass spectrometer using helium as the carrier gas, and equipped with an HP-5MS capillary column. The oven temperature was programmed from 80 to 250°C (5°C/min), and maintained for 30 min. After that, samples were injected at 250°C. The degradation products were identified by comparing their mass spectrum with the one from the NST database and checked by comparison of the retention times with that of naphthalene as reference sample. For that purpose, the extraction of degradation products from EVA samples was performed using 5 mg of sample, cut into small pieces, mixed with 10 mL chloroform in a 20 mL glass vial and ultrasonicated in a Branson 2210 apparatus for 2 h in a hot water bath held at 60°C. The extract obtained was concentrated by total evaporation of solvent at room temperature. Afterwards, 2 mL of chloroform and 20 μL of stock chloroform-solution of naphthalene (1 g/L) as internal standard were added. The extract was filtered through a 0.2 mm filter prior to analysis⁵ by GC-MS.

Chemiluminescence

Chemiluminescence emission of film samples were obtained as described earlier²³ and using a CL400 ChemiLUME apparatus developed by Atlas Electric Devices Co. Samples for chemiluminescence measurements were prepared by cutting circular specimens of 12 mm in diameter from the polymer films; hence the emission area was maintained constant in all the experiments. The film samples were held in aluminum dishes and two different types of tests were performed: A) Isothermal: samples of material are preheated up to the test temperature (170°C) under nitrogen or oxygen, and the temperature of the test maintained constant. B) Dynamic: material samples are heated up with pre-test ramp (2°C/min.) under constant flow of nitrogen (50 mL/min.). Chemiluminescence signal from film samples were collected in a water-cooled photon counting photomultiplier, which was previously calibrated using a radioactive standard provided by Atlas. The data collected were processed using the specific software supplied with the instrument.

Ageing

The accelerated photodegradation of the films was carried out during 432 h (18 days) in a ATLAS/SUNTEST XLS provided with a 2500W Xenon lamp and a solar filter (borosilicate). Incident energy was



Scheme 1 Degradation mechanisms of ethylene-vinyl acetate copolymers.

fixed at 550 W/m^2 in the interval $300\text{-}800\text{ nm}$ using a XenoCal[®] WB 300-800 irradiance sensor. Temperature was maintained constant at 45°C during the testing program set. Exposed samples were mounted on metallic plates ($1 \times 4\text{ cm}$) and were periodically taken out and characterized.

Bioassay procedure and indirect impedance technique

Aerobic biodegradation of polyethylene film samples by bacteria were conducted at 30 and 45°C in bioreactors of 7 mL of capacity, filled with 1 g of sterile silica and 1.5 mL of bacteria suspension in Minimal Growth Medium (MGM) of 2.5×10^7 cells/mL of concentration, prepared as detailed before.²⁴ The composition of MGM used in this work contained: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 8 g , K_2HPO_4 2 g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g , NaSO_4 0.5 g , $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8 mg , $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mg , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg , CaCl_2 0.05 g , distilled water 1000 mL . In this way, a suspension of each bacterium was prepared and in the case of the mixture of *Bacillus*, MIX, equal parts of each suspension were mixed. After that, 10 discs of film samples of 4 mm of diameter (5 mg) were added to the medium. These containers were introduced in disposable cylindrical cells of 20 mL charged with 1.5 mL of 2 g/

L KOH aqueous solution and provided by four stainless steel electrodes to measure impedance on a Bac-Trac 4300 (SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkerdorf, Austria). The experimental device and procedure were described before.¹⁹ The device monitors the relative change in the initial impedance value of KOH solution which is converted in concentration of carbon dioxide by a calibration curve of impedance variation versus concentration of CO_2 . The percentage of biodegradation of the sample can be calculated taking in account the theoretical amount of carbon dioxide ($[\text{CO}_2]_{\text{Theor.}}$) of the sample, % biodegradation = $[\text{CO}_2]_t \cdot 100 / [\text{CO}_2]_{\text{Theor.}}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of photodegradation of EVA films by ATR-FTIR and chemiluminescence

The infrared spectra of EVA-films show notable changes of characteristic bands corresponding to functional groups which appear with irradiation time. In Scheme 1, the different reactions that take place in the mechanism of EVA-photodegradation are compiled.^{11,25}

EVA mulching films prepared in this work were characterized by ATR-FTIR and the relative change in functional groups after 432 h of irradiation are

TABLE I
Carbonyl Index Values of Different Characteristics Bands of EVA (9% of VAc) Containing Ca and Fe Stearates, Initial and After 432 h of Irradiation Time

Film sample	A_{1735}/A_{2850}	A_{1715}/A_{2850}	A_{1238}/A_{2850}	A_{1175}/A_{2850}	A_{1780}/A_{2850}
EVA	0.30	0.03	0.35	0.03	0.01
EVA Photodeg.	0.28	0.10	0.33	0.08	0.02
EVA-Ca	0.53	0.06	0.61	0.06	0.01
EVA-Ca Photodeg.	0.44	0.28	0.53	0.14	0.07
EVA-Fe	0.53	0.07	0.60	0.06	0.01
EVA-Fe Photodeg.	0.44	0.25	0.46	0.17	0.04

reported in Table I. The Carbonyl Index (CI) evolution with photodegradation confirmed the growth of two characteristics absorptions, shoulder at 1715 cm^{-1} and broadband at 1175 cm^{-1} , assigned to ketone carbonyl structure. Ketone groups are formed from vinyl acetate moieties by Norrish I and hydroperoxide cleavage reactions as shown in Scheme 1, A and B respectively. At the same time, a decrease of the ester CI was observed after photodegradation on the ester (acetate) absorption band at 1735 cm^{-1} and the vibration at 1238 cm^{-1} assigned to the asymmetric stretching frequency $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ of the acetate.^{26,27} With the photodegradation of the EVA film a new carbonyl vibration was observed at 1780 cm^{-1} that was assigned²⁷ to the lactone formation via back-biting process, Scheme 1 reaction D. The presence of Ca and Fe stearates increases the differences of CI after photodegradation.

The evolution of the CI of the 1715 cm^{-1} ketone band with irradiation time is shown in Figure 1. Calcium and iron stearates increased notably the ketone formation via acetaldehyde elimination (Scheme 1A) respect to the pure EVA. This behavior confirms the efficient pro-oxidant effect of the stearates as it was earlier observed in polyethylene.¹²

The analysis of non-isothermal chemiluminescence runs under nitrogen atmosphere for initial and pho-

todegraded samples provides a useful tool to evaluate the activity of stearates as pro-oxidants, both during processing and photoageing of the films, Figure 2.

The CL-temperature curves for pure EVA showed the increase of intensity when the molten state region of the film (above 105°C) is reached. In the melt, the mobility of the peroxy radicals and their bimolecular termination reaction, responsible for the chemiluminescence emission in the polymers, is favoured. In the initial films the presence of pro-oxidants decreased slightly the onset temperature of the CL-emission (EVA-Ca, $T_{\text{CLonset}} = 160^\circ\text{C}$; EVA-Fe, $T_{\text{CLonset}} = 175^\circ\text{C}$) respect to the pure EVA ($T_{\text{CLonset}} = 190^\circ\text{C}$) indicating a higher hydroperoxide formation and slight trend towards oxidation during film processing. The photodegradation of the EVA films after 432 h of irradiation time produced drastic changes on the CL-Intensity profiles and CL emission shifted towards lower temperatures under the EVA melt temperature. The effect of pro-oxidants was evidently significant, and in presence of calcium and iron stearates, the formation of peroxide peaks was observed at lower temperatures, Figure 2. These intense emissions would indicate that higher amounts of hydroperoxides were induced by the

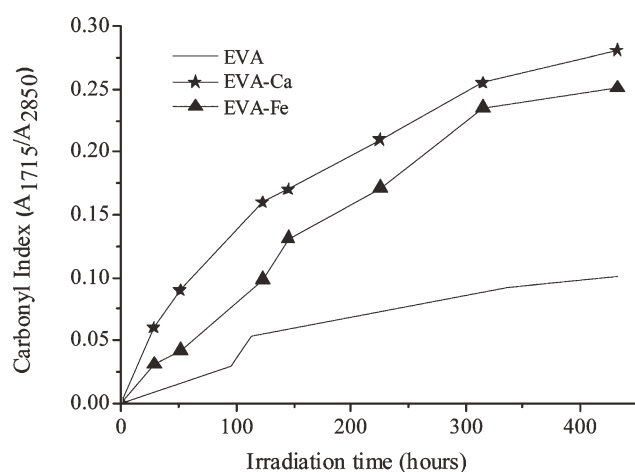


Figure 1 Carbonyl Index profile of ketone carbonyl band of EVA films at different irradiation times.

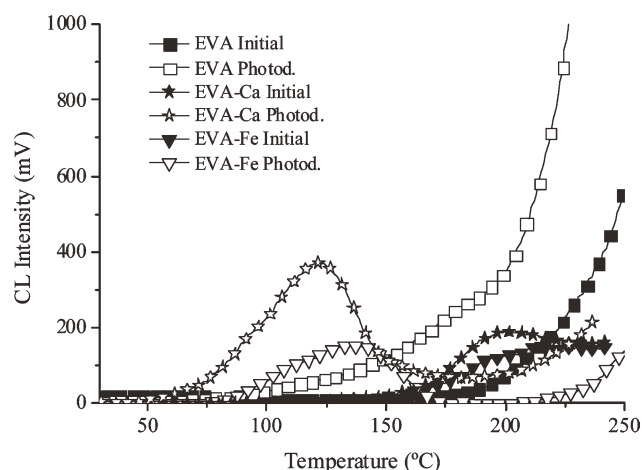


Figure 2 Chemiluminescence temperature-ramping curves obtained for initial and photodegraded (432 h) EVA films under nitrogen.

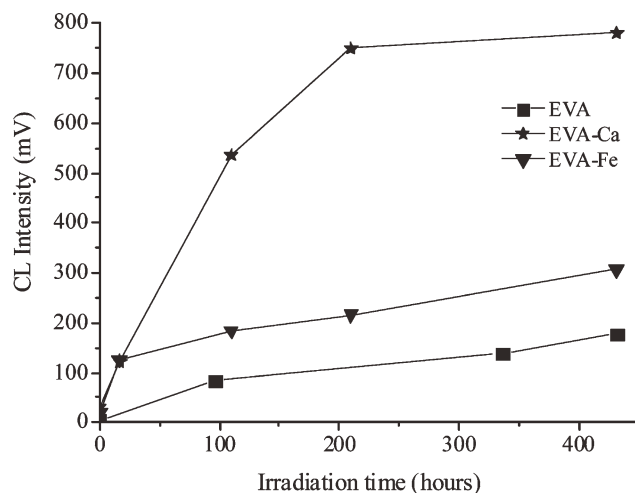


Figure 3 Chemiluminescence intensity determined at 170°C under nitrogen versus photoageing time of EVA films.

action of pro-oxidants during photoageing of the EVA films.

The evolution of CL-Intensity profiles with irradiation time is represented in Figure 3, for the EVA films. The results confirm a higher degree of degradation of samples containing Ca and Fe stearates respect to pure EVA. This higher hydroperoxide formation in the films containing pro-oxidants would be on agreement with the higher content of carbonyl species analyzed by ATR-FTIR, Figure 1.

Also, the activity of pro-oxidants on thermal oxidation of EVA was studied on CL intensity-time runs under oxygen, Figure 4.

The chemiluminescence emission was enhanced with respect to that obtained under nitrogen, since under oxygen the samples were oxidized in a diffusion-controlled reaction simultaneously to the emission. The isothermal CL curves of EVA films exhibited double stage of oxidation, oxygen independent and oxygen diffusion-controlled reactions, with different oxidation rate during the processes, typical of polyethylenes.^{28,29} The first maxima appeared as

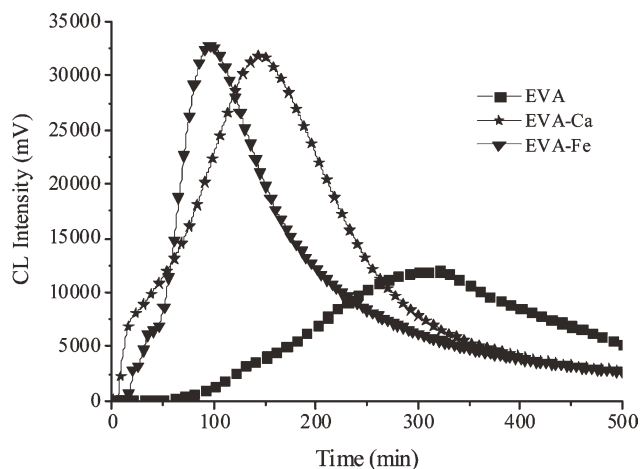


Figure 4 Chemiluminescence curves for initial EVA films obtained at 170°C under oxygen.

shoulder of the curve as found earlier¹² for polyethylene.³⁰ The chemiluminescence intensity of second maxima was seen to be highly affected with incorporation of stearates and CL was enhanced and shifted to lower oxidation time respect to pure EVA. This fact can be associated to the decomposition of hydroperoxides catalyzed by the presence of metal ion complexes, leading to the generation of free radicals, which initiate the oxidation³¹ of the polyethylene sequences of EVA.

Evaluation of photodegradation of EVA films by thermal analysis

EVA films before and photodegraded, pure and with pro-oxidants, were studied by thermal analysis. EVA films exhibited a single broad endothermic peak profile on DSC before and after 432 h of irradiation. The endotherms started at a low temperature of 60°C, involving no well defined secondary crystallizations and showed a single major melting peak due to the primary crystallization,³² the data are compiled in Table II. The melting peak temperatures

TABLE II
DSC, TGA, and DTGA Results of EVA Films Initial and After 432 h of Irradiation Time

Film sample	DSC			TGA				DTGA	
	T_m (°C)	X_c (%)	OIT (s)	T_{onset} (°C)	T_{10} (°C)	T_{50} (°C)	ΔW_1 (%)	T_{st1} (°C)	T_{st2} (°C)
EVA	105	24	170	349	415	460	8.4	359	469
EVA Photodeg.	105	25	–	293	362	450	16.1	358	460
EVA-Ca	103	23	116	349	420	473	9.2	371	479
EVA-Ca Photodeg.	103	28	–	276	356	466	19.7	372	480
EVA-Fe	103	23	117	357	395	478	8.6	371	484
EVA-Fe Photodeg.	103	27.9	–	285	368	472	18.2	369	482

T_m , melting peak of primary crystallization; X_c , percentage of crystallinity; OIT, oxidation induction time; T_{onset} , onset temperature of weight loss (weight loss at 3%); T_{10} and T_{50} , temperatures corresponding to 10 and 50% weight loss respectively; ΔW_1 , weight loss in the first stage corresponding to deacetylation; T_{st1} and T_{st2} , temperatures of the maximal degradation rates of stages 1 and 2 respectively; –, not determined.

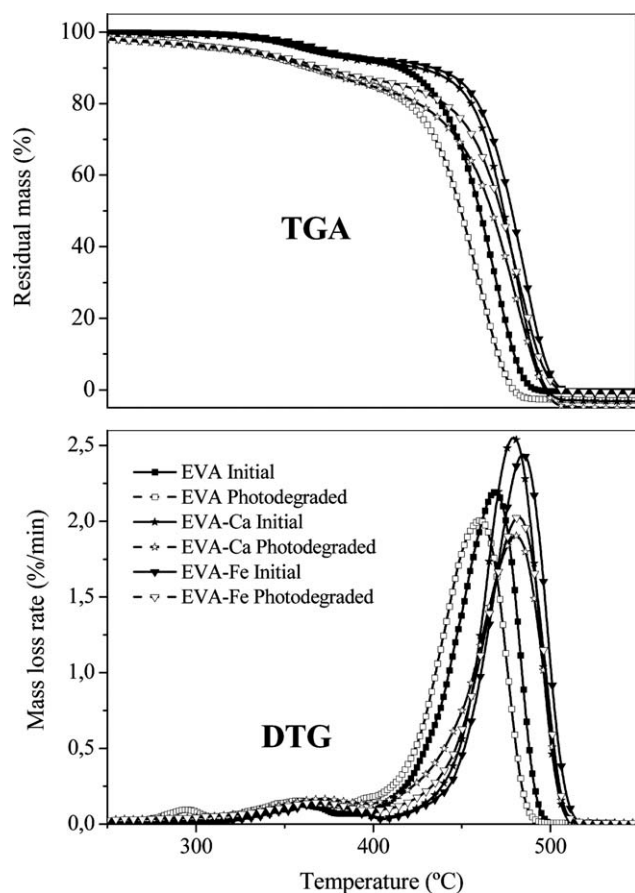


Figure 5 TGA and DTGA thermostability profiles of EVA (9% of VAc) films containing Ca and Fe, initial and photodegraded after 432 h of irradiation time.

remained constant after ageing confirming that the primary crystalline regions of the EVA films are stable and the photodegradation process takes place in the amorphous phase of the material. Photodegradation of EVA samples induced a slight growth in the overall crystallinity ($\% \chi_c$), this effect has been reported in EVA by other authors.¹¹ During ageing, high temperature environment allowed physical annealing of EVA-material³³ and ethylene chain segments of the EVA in the secondary crystallization region are able to re-arrange. The amorphous phase degradation produces less intra/inter-molecular entanglement in macromolecules and also facilitates their re-arrangement or recrystallization during ageing.³⁴ The lower stability of the films containing pro-oxidants is evidenced by the values of the Oxidation Induction Times (OIT) determined by DSC, Table II.

The thermal stabilities of photodegraded EVAs under nitrogen are shown in Figure 5, where both thermogravimetric (TGA) and derivative thermogravimetric (DTGA) are plotted versus temperature in the Interval 100–550°C.

Two weight loss steps are observed like in poly(vinyl acetate), the first one under 400°C due to the

autocatalytic deacetylation in the acetate fraction of EVA (Norrish II reaction, Scheme 1C) and, the second one, in the interval 400–520°C where the complete chain scission of the residual material takes place. In Table II, all the characteristic parameters of the EVA thermostabilities are compiled. In the initial films, the first weight loss (ΔW_1) of the initial films is close to the 9% of acetate content present in the EVA indicating an efficient deacetylation in the first thermal decomposition stage. After 432 h of irradiation the weight loss in the first stage increases and, in particular, in the materials containing pro-oxidants the values shift from 9.2 to 19.7% on EVA-Ca and from 8.6 to 18.2% on EVA-Fe. In the photodegraded EVA films, deacetylation is accompanied by the elimination of terminal active units on the degraded shorter main-chains of EVA. Jin et al.¹¹ obtained similar results, in the photodegradation of EVA's of 14 and 18%.

TGA characteristics temperatures in the Onset, 10% and 50% of weight loss decrease in the photodegraded EVAs respect to the initial films confirming that chain scission is the responsible of diminution in thermal stability. The peak position of stage 1 and 2, analyzed by DTGA (T_{st1} and T_{st2}) do not change with photodegradation for each EVA film, indicating that the decrease in molecular weight do not affect the maximum decomposition rate.^{11,35}

The photodegradation of the EVA films during 432 h of irradiation decreases the molecular weight as it is evidenced by the GPC data compiled in Table IV. The effect of Ca and Iron stearates produced a drastic reduction of molecular weight of the EVA films.

The increased pro-oxidative ability of iron stearate respect to calcium stearate may be related to the fact that pro-oxidants based on metal combinations capable of yielding two metal ions of similar stability and with oxidation number differing by one unit only exhibited stronger catalytic effect.³⁶

In all the solutions prepared with photodegraded materials for GPC analysis, gel formation was detected and the crosslinking level of samples was lower than 5% in agreement with other authors.^{4,11,37} Molecular weight measured by GPC refers to non-crosslinked fractions and a decrease in the polydispersity value was observed by GPC (Table IV) in Ca and Fe photodegraded samples, in agreement with similar results published by other authors.¹¹

Evaluation of biodegradation by ATR-FTIR, chemiluminescence, and GC-MS product analysis

In previous works of polyethylene biodegradation in the presence of pro-oxidants,^{18,38} a drastic effect of temperature was observed in the biodegradation assays. The mineralization of photodegraded

TABLE III
Carbonyl Index Values of Characteristics Bands of EVA-9% of VAc Containing Ca and Fe Stearates, After 432 h of Irradiation and After 90 Days of Bioassay Using a Mixture of *Bacillus* (MIX) and the Bacterium *Brevibacillus borstelensis*

Film sample	A_{1735}/A_{2850}			A_{1715}/A_{2850}			A_{1238}/A_{2850}			A_{1175}/A_{2850}		
	Phot.	MIX	<i>B.bors.</i>	Phot.	MIX	<i>B.bors.</i>	Phot.	MIX	<i>B.bors.</i>	Phot.	MIX	<i>B.bors.</i>
EVA	0.28	0.11	0.07	0.10	0.04	0.02	0.33	0.16	0.10	0.08	0.06	0.05
EVA-Ca	0.44	0.08	0.08	0.28	0.06	0.05	0.53	0.11	0.09	0.14	0.08	0.04
EVA-Fe	0.44	0.16	0.10	0.25	0.16	0.03	0.46	0.21	0.14	0.17	0.11	0.08

polyethylenes increased substantially at 45°C being extremely slow at 30°C. For this reason, biodegradation of EVA was only performed at 45°C.

The carbonyl index (CI) values measured by ATR-FTIR for the photodegraded EVA films after 90 days

of bacterial biodegradation are summarized in Table III.

Incubation of the photo-oxidized EVA-films with *B. borstelensis* and MIX at 45°C for 90 days showed a marked reduction in the amount of carbonyl groups

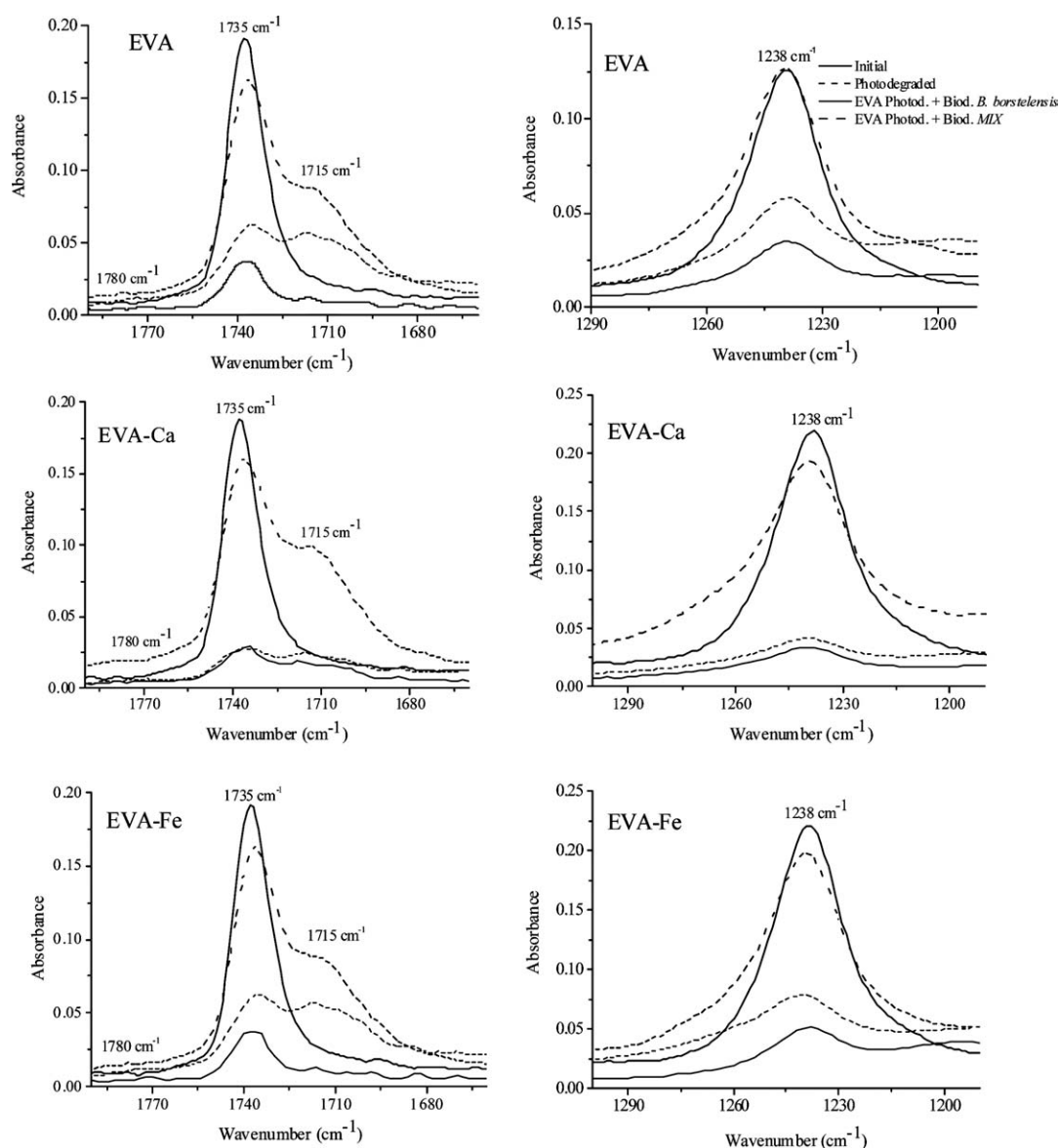


Figure 6 FTIR spectra of EVA films, initial, photodegraded after 432 h of photoageing and after 90 days of bacterial biodegradation at 45°C.

TABLE IV
GPC Data of Number-Average Molecular Weight (M_n), Weight-Average Molecular Weight (M_w), Peak Top Molecular Weight (M_p), and the Polydispersity of Initial, Photodegraded After 432 h of Irradiation, and After 90 Days of Biodegradation by the Mixture of *Bacillus*, MIX

Simple	Initial				Photodegraded				Phot. + Biod. MIX			
	M_n	M_w	M_p	PD	M_n	M_w	M_p	PD	M_n	M_w	M_p	PD
EVA	11,060	87,700	28,300	7.9	3430	29,100	5870	8.5	–	–	–	–
EVA-Ca	8530	33,900	18,822	4.0	2800	6680	3710	2.8	2200	51,270	4050	23.2
EVA-Fe	13,600	119,500	38,900	8.8	2280	14,240	3840	6.2	1380	6700	2650	4.8

–, not determined.

estimated in terms of carbonyl index. The percentages of CI decrease are higher when the biodegradation was carried out on higher photodegraded films containing calcium and iron stearates.

The metabolic action at 45°C of *B. borstelensis* and MIX reduced the carbonyl absorption bands in the ATR-FTIR. In Figure 6, the decrease of the carbonyl absorption bands (at 1735 cm⁻¹ and 1238 cm⁻¹ of the acetate, 1715 cm⁻¹ ketone carbonyl and 1780 cm⁻¹ lactone carbonyl) is shown for EVA after 90 days of bacterial bioassay together with the corresponding absorption bands of initial and photodegraded films.

The decrease in carbonyl groups on photo-oxidized EVA can be attributed to the preferential microbial assimilation of ester/carbonyl compounds formed during abiotic oxidation. Oxo-biodegradation of polyolefins, like EVA, involves a first step of oxidation followed by a second step of microbial degradation. In this work the biodegradation of EVA chains starts with the photooxidation during the first abiotic step that induced deacetylation and formed hydroperoxides and carbonyl species (ketones) that decreased the molecular weight by chain scission reactions. In Table IV, the changes in molecular weight with biodegradation are compared together with the corresponding photodegraded EVA materials.

After 90 days of biodegradation by the mixture of *Bacillus* MIX, the distribution determined by GPC analysis shifts, Figure 7, toward the left in the presence of pro-oxidants, slightly in the case of EVA-Ca

and pronounced in the case of EVA-Fe. The biodegraded EVA film sample was not possible to analyze due to the gel formation and the difficulties to filtrate before GPC injection. The effect of gel formation was also observed in biodegraded materials and, in the case of biodegraded EVA-Ca (Table IV) a small amount of gel that pass through the filter contributes to an enormous M_w value.

The values of polydispersity ratio are lower in the biodegraded EVA-Fe indicating that low molecular weight fragments are consumed faster than the higher oxidized fragments.

As expected, increase biodegradation of EVA was observed, since the more chemically oxidized EVA structures are more susceptible to microbial attack as described in polyethylenes. The decrease in number-average molecular weight (M_n) produced by the mixture of *Bacillus* MIX, after 90 days at 45°C, is in the same range interval (EVA-Ca, 22% and EVA-Fe, 40%) than that observed by other authors,³⁹ 34% on photodegraded LDPE/pro-oxidant system using *B. borstelensis* (90 days liquid culture at 50°C).

The effect of bacterial biodegradation in molecular weight distributions is enhanced by photodegradation and the catalytic effect of calcium and iron stearates on the abiotic degradation step. To confirm the biodegradation of low-molecular weight products generated in the first abiotic step a quantitative analysis of the degradation products was carried out after solvent extraction by ultrasonication.⁴⁰ The

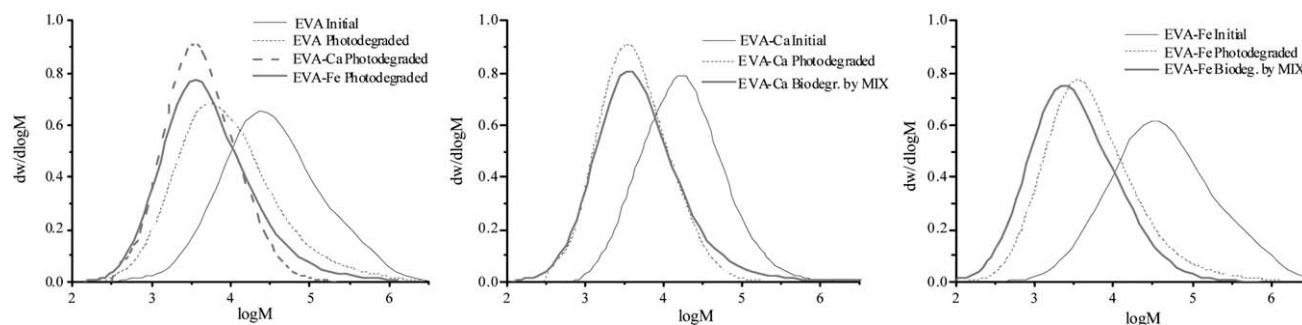


Figure 7 Molecular weight distribution curves determined by GPC of EVA films, initial, photodegraded after 432 h of irradiation and after 90 days of bacterial biodegradation.

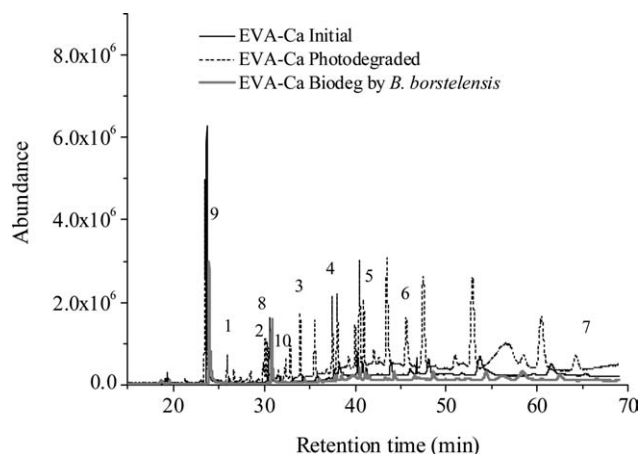


Figure 8 GC-MS chromatogram of the products extracted from initial, photodegraded, and biodegraded EVA films. Different products were identified: (1) Octadecane, (2) Tetracosane, (3) Heptacosane, (4) Eicosane, (5) Octacosane, (6) Nonacosane, (7) Tricontane, (8) Decanol, (9) Tetradecanol, and (10) Octadecanol.

extracted products from EVA film samples, initial, photodegraded (432 h) and after 90 days of biodegradation by bacteria were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) for comparison. Similar results were observed using the mixture of *Bacillus* MIX and *B. borstelensis*, the chromatograms obtained using the later bacterium in the biodegradation of EVA-Ca is plotted in Figure 8.

The degradation products extracted and identified from the photodegraded EVA were basically hydrocarbons (saturated and unsaturated) and alcohols of higher molecular weight, as is shown in Figure 8. The hydrocarbons that were present in relatively high concentrations in photodegraded EVA containing pro-oxidants, were found at a significantly lower concentration in EVA without stearates.

After the bacterial treatment at 45°C the low-molecular-weight products were almost absent, at the level present in the initial EVA. This fact is in accordance with the biodegradation mechanism of lin-

ear paraffin chains or *n*-alkanes up to tetratetracontane ($C_{44}H_{90}$).⁴¹ Our results confirm that bacteria employed in this work biodegrade extractable low-molecular-weight compounds but also can perturb high-molecular-weight fractions than 5000 Da, which is in agreement with the findings of other authors.^{16,18,42,43}

In earlier works, chemiluminescence emissions measured on polymer films were able to quantify the oxidation produced by microorganisms in the structure of gelatin,²⁰ cellulose triacetate,⁴⁴ and photodegraded polyethylene¹⁸ due to their metabolism. The CL emission of EVA-films after 432 h of irradiation and after 90 days of bacterial bioassay was studied by temperature-ramping tests under nitrogen, Figure 9.

The onset of the CL emission shifted toward lower temperatures for the biodegraded samples and in general the intensity of the low-temperature peaks increase. In almost all the biodegraded EVA films containing calcium and iron stearates two peaks emissions were observed (Table II), and their onset temperatures (around 45°C) were significantly lower than that measured for the pure EVA. These results confirm the efficient oxidation activity of the microorganisms at 45°C as observed in polyethylene.¹⁸

Carbon dioxide production in the biodegradation of EVA films

Biodegradation at 45°C was studied by determining the carbon dioxide produced in the metabolic action of the bacteria, using the indirect impedance technique. The time courses of carbon mineralization at 45°C of the photodegraded EVA films are reported in Figure 10. for the mixture of *Bacillus* (MIX) and *B. borstelensis*.

From the results plotted in Figure 6, biodegradation of photodegraded EVA films started from the beginning of the bioassay and the production of CO_2 was faster when Ca and Fe stearates are present in the formulations. Biodegradation by MIX and *B. borstelensis*

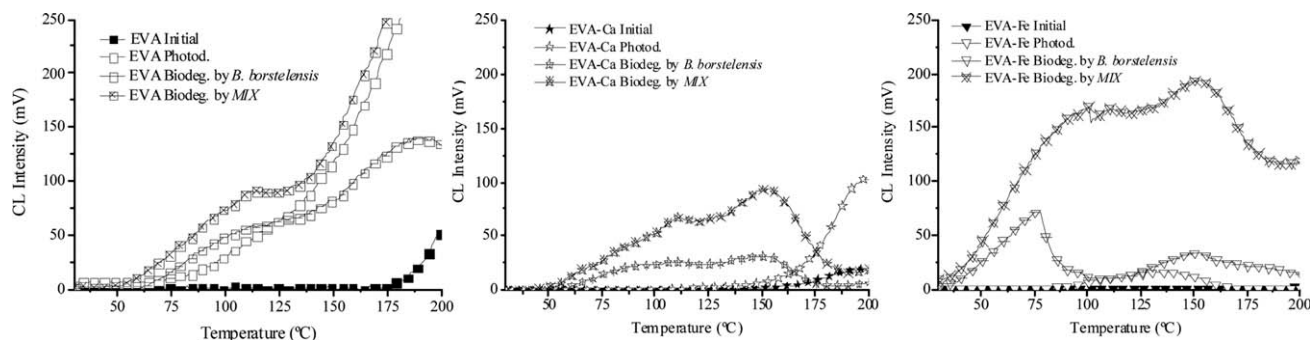


Figure 9 Chemiluminescence temperature-ramping curves obtained from EVA films under nitrogen, initial, photodegraded after 432 h of irradiation and after 90 days of bacterial biodegradation at 45°C.

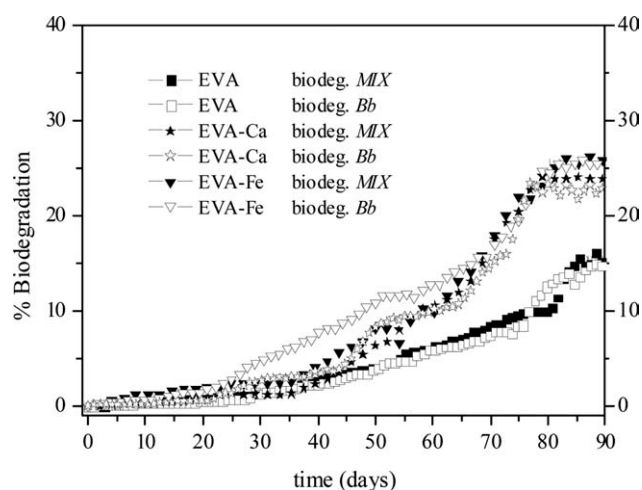


Figure 10 Percentage of carbon mineralization at 45°C, determined from carbon dioxide measurements in the biodegradation of EVA films by the mixture of *Bacillus*, MIX, and *B. borstelensis*.

exhibited a pronounced difference between the pure photodegraded EVA films (around 15% of biodegradation after 90 days) and the corresponding materials containing Ca and Fe pro-oxidants (23–26% of biodegradation after 90 days).

No significant differences were found between both series of bioassays using *B. borstelensis* and the mixture of *Bacillus* MIX on photodegraded EVA films. Only *B. borstelensis* seems to be faster in the mineralization of photodegraded EVA-Fe after the 3 weeks of bioassay but the final percentage of biodegradation was in the same order than that found for the biodegradation of MIX. The percentages of biodegradation reached on photodegraded EVA are higher than the obtained for polyethylene by Hadad et al.³⁹ and by us¹⁸ using the same bacterial strains, where LDPE mineralization extents reached values of 11.5% with *B. borstelensis* and 7–10% with the mixture of *Bacillus* (MIX).

The percentages of mineralization reported here show that the mixture of *Bacillus* MIX and the bacterium *B. borstelensis* were able to use photodegraded EVA films as the sole carbon source. The nature of EVA in VAc content is important in comparison to polyethylene but the presence of metals and the extent of abiotic degradation of the materials will be crucial to allow a second step in the biodegradation process. We believe that the key factors will be the selection of the microorganisms and the control of the bioassay conditions. It is clear that the presence of random vinyl acetate co-monomer in the polyethylene chain increases the biodegradation extent because of the effectiveness of deacetylation and photo-oxidation processes. The presence of pro-oxidants in the EVA formulations could be an interest-

ing way to prepare more efficient biodegradable materials.

CONCLUSIONS

The photodegradation of EVA films after 432 h of irradiation produced notable changes on the ATR-FTIR spectra. Carbonyl Indexes evolution after irradiation confirmed the growth of ketone carbonyl structures (1715 cm^{-1}) and the appearance of a new band assigned to a lactone generation (1780 cm^{-1}). Simultaneously, a decrease on the ester (acetate) absorption band (1735 cm^{-1}) was observed. The presence of calcium and iron stearates increased the differences of CIs after photodegradation confirming the efficient pro-oxidant effect of these additives.

Photodegradation produced drastic changes on the Chemiluminescence (CL) emission profiles and CL-temperature curves shifted towards lower temperatures and, in particular, when both stearates are present in the EVA-formulations. Under oxygen, isothermal CL-curves of EVA films exhibited double stage of oxidation, typical of polyethylenes.

EVA films were studied by DSC and photodegradation induced a slight growth in the overall crystallinity due to a re-arrangement or recrystallization during ageing. The Oxidation Induction Times determined by DSC confirmed the lower stability of the films containing pro-oxidants.

In the thermograms obtained by TGA, two weight loss steps were observed. The first stage under 400°C , includes deacetylation in the VAc units and, the second one, in the interval $400\text{--}520^\circ\text{C}$ is due to decomposition of the material by chain scission. In the photodegraded EVA films deacetylation was accompanied by decomposition of other unstable structures. The molecular weight of the films samples decrease after photodegradation. The presence of Ca and Fe stearates produced a drastic reduction on the M_w of the photodegraded EVA-films.

Biodegradation of photodegraded EVA films were tested at 45°C during 90 days of bacterial treatment with a mixture of *Bacillus* (MIX) and the bacterium *Brevibacillus borstelensis*. The metabolic action of both series of experiments showed a marked reduction in the amount of carbonyl groups estimated in terms of Carbonyl Indexes determined by ATR-FTIR. This bacterial consumption of carbonyl group functionalities on photo-oxidized EVA can be attributed to the preferential microbial assimilation of ester/carbonyl compounds formed during photodegradation. After 90 days of biodegradation by the mixture of *Bacillus* MIX, the molecular weight distribution determined by GPC analysis shift toward low molecular weight, and in particular in the case of EVA-Fe.

The product extracted and identified from EVA films using GC-MS, were present at relatively high

concentrations in photodegraded EVA containing pro-oxidants, but after bacterial treatment, low molecular-weight products were almost absent and at the level of the initial EVA. Bacteria studied in this work employed extractable low-molecular weight compounds as nutrients.

Mineralization of photodegraded EVA-films was studied by determining the carbon dioxide produced in the metabolic action of bacteria, using indirect impedance technique. No significant differences were found between both series of bioassays using *B. borstelensis* and the mixture of *Bacillus* MIX. Biodegradation by these bacteria exhibited a drastic difference between the pure photodegraded EVA film (around 15% of biodegradation after 90 days) and the corresponding materials containing Ca and Fe pro-oxidants (23–26% of biodegradation after 90 days).

The results obtained in this work confirm that the presence of random vinyl acetate co-monomer and the addition of pro-oxidants in the polyethylene chain increase the biodegradation extent because of the effectiveness of deacetylation and photo-oxidation processes.

Also, one of the authors C.A. thanks MICINN for a Ramon y Cajal contract.

References

- Espí, E.; Fontecha, A.; García-Alonso, Y.; Marín, A.; Salmerón, A. *Plasticulture* 2004, 123, 72.
- Gilby, G. W. In Whelan, A.; Lee, K. S., editors. *Developments of Rubber Technology-3*. London: Applied Science Publishers Ltd.; 1982. p 101, chapter 4.
- Kojima, T.; Yanagisawa, T. *Solar Energy Mater Solar Cells* 2004, 81, 119.
- Ayutthaya, S. I. N.; Wootthikanokkhan, J. *J Appl Polym Sci* 2008, 107, 3853.
- Globus, A.; Hornby, G.; Larchev, G.; Hancher, M.; Cannon, H.; Lohn, J. *Teleoperated modular robots for lunar operations*. Chicago, IL, United states: American Institute of Aeronautics and Astronautics Inc 2004. p. 788–807.
- Skowronski, T.; Rabek, J. F.; Ranby, B. *Polym Eng Sci* 1984, 24, 278.
- Ali, Z. I. *J Appl Polym Sci* 2007, 104, 2886.
- Sharif, J.; Dahlan, K. Z. M.; Yunus, W. M. Z. W. *Radiat Phys Chem* 2007, 76, 1698.
- Copuroglu, M.; Sen, M. *Polym Adv Technol* 2005, 16, 61.
- Morlat-Therias, S.; Fanton, E.; Gardette, J. L.; Peeterbroeck, S.; Alexandre, M.; Dubois, P. *Polym Degrad Stab* 2007, 92, 1873.
- Jin, J.; Chen, S.; Zhang, J. *Polym Degrad Stab* 2010, 95, 25.
- Pablos, J. L.; Abrusci, C.; Marín, I.; López-Marín, J.; Catalina, F.; Espí, E.; Corrales, T. *Polym Degrad Stab* 2010, 95, 2057.
- Peinado, C.; Allen, N. S.; Salvador, E. F.; Corrales, T.; Catalina, F. *Polym Degrad Stab* 2002, 77, 523.
- Schard, M. P.; Russel, C. A. *J Appl Polym Sci* 1964, 8, 985.
- Kron, A.; Stenberg, B.; Reitberg, T.; Billingham, N. C. *Polym Degrad Stab* 1996, 53, 119.
- Chiellini, E.; Corti, A.; Swift, G. *Polym Degrad Stab* 2003, 81, 341.
- Jakubowicz, I. *Polym Degrad Stab* 2003, 80, 39.
- Abrusci, C.; Pablos, J. L.; Corrales, T.; López-Marín, J.; Marín, I.; Catalina, F. *Int Biodet Biodeg* 2011, 65, 451.
- Abrusci, C.; Marquina, D.; Del Amo, A.; Catalina, F. *Int Biodet Biodeg* 2007, 60, 137.
- Abrusci, C.; Marquina, D.; Santos, A.; Del Amo, A.; Corrales, T.; Catalina, F. *J Photochem Photobiol A: Chem* 2007, 185, 188.
- Rodriguez-Vazquez, M.; Liauw, C. M.; Allen, N. S.; Edge, M.; Fontan, E. *Polym Degrad Stab* 2006, 91, 154.
- Flory, P. J.; Vrij, A. *J Am Chem Soc* 1963, 85, 3548.
- Catalina, F.; Peinado, C.; Allen, N. S.; Corrales, T. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2002, 40, 3312.
- Abrusci, C.; Martín-González, A.; Del Amo, A.; Corrales, T.; Catalina, F. *Polym Degrad Stab* 2004, 86, 283.
- Allen, N. S.; Edge, M.; Rodriguez, M.; Liauw, C. M.; Fontan, E. *Polym Degrad Stab* 2000, 68, 363.
- Haken, J. K.; Werner, R. I. *Br Polym J* 1971, 3, 157.
- Haslam, J.; Willis, H. A.; Squirrell, D. C. M. *Identification and Analysis of Plastics*, 2nd ed.; Butterworth: London, 1972, p. 178.
- Zlatkevich, L. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 1985, 23, 1691.
- Broska, R.; Rychly, J. *Polym Degrad Stab* 2001, 72, 271.
- Corrales, T.; Escudero, M.; Quijada, R.; Catalina, F.; Abrusci, C. *Eur Polym J* 2009, 45, 2708.
- Jirackova-Audouin, L.; Verdu, J. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 1987, 25, 1205.
- Brogly, M.; Nardin, M.; Schultz, J. *J Appl Polym Sci* 1997, 64, 1903.
- Chen, S. J.; Zhang, J.; Su, J. *J Appl Polym Sci* 2009, 112, 1166.
- Liu, M.; Horrocks, A. R.; Hall, M. E. *Polym Degrad Stab* 1995, 49, 151.
- Zhao, W.; Zhong, X.; Yu, L.; Zhang, Y.; Sun, J. *Polymers* 1994, 35, 3348.
- Jakubowicz, I. *Polym Degrad Stab* 2003, 80, 39.
- Yao, D. H.; Qu, B. J.; Wu, Q. H. *Polym Eng Sci* 2007, 47, 1761.
- Fontanella, S.; Bonhomme, S.; Koutny, M.; Husarova, L.; Brunsen, J. M.; Courdavault, J. P.; Pitteri, S.; Samuel, G.; Pichon, G.; Lemaire, J.; Delort, A. M. *Polym Degrad Stab* 2010, 95, 1011.
- Hadad, D.; Geresh, S.; Sivan, A. *J Appl Microbiol* 2005, 98, 1093.
- Contat-Rodrigo, L.; Haider, N.; Ribes-Greus, A.; Karlsson, S. *J Polym Sci* 2001, 79, 1101.
- Haines, J. R.; Alexander, M. *Appl Microbiol* 1975, 28, 1084.
- Roy, P. K.; Titus, S.; Surekha, P.; Tulsi, E.; Deshmukh, C.; Rajagopal, C. *Polym Degrad Stab* 2008, 93, 1917.
- Kawai, F.; Watanabe, M.; Shibata, M.; Yokoyama, S.; Sudate, Y.; Hayashi, S. *Polym Degrad Stab* 2004, 86, 105.
- Abrusci, C.; Marquina, D.; Santos, A.; Del Amo, A.; Corrales, T.; Catalina, F. *Int Biodet Biodeg* 2009, 63, 759.

