

Degradación enzimática de mezclas polietileno de baja densidad/almidón termoplástico

Carlos S. Tena Salcido^A, Francisco J. Rodríguez González, Zahida Sandoval Arellano

Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)
carlostena46@hotmail.com.mx; fcordz@ciqa.mx; zahida20@hotmail.com

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la morfología sobre la degradación enzimática de mezclas de LDPE/almidón termoplástico (ATP). Se determinó la pérdida de peso de los materiales y el grado de hidrólisis por las técnicas de azúcares reductores, totales y contenido de glucosa. El análisis de la cinética de degradación enzimática puso de manifiesto una fuerte dependencia de la solubilización de la fase almidón con respecto al porcentaje de área superficial de las partículas de ATP. La concentración de almidón disuelto en el cóctel enzimático fue el factor que controló la generación de azúcares reductores durante el proceso de hidrólisis enzimática.

PALABRAS CLAVE

Mezclas de polímeros, morfología, degradación enzimática.

ABSTRACT

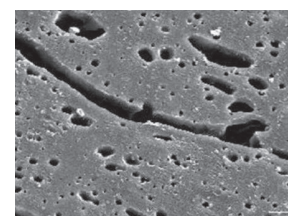
The effect of morphology on the enzymatic degradation of LDPE/Thermoplastic starch (TPS) blends was evaluated. Weight loss and hydrolysis degree (by means of reducing sugars) were determined during enzymatic attack. Moreover, fractionation of hydrolyzed starch components was performed and the different fractions were evaluated by total sugars and glucose content. The analysis of enzymatic degradation kinetics showed a strong dependence of starch dissolution with respect to the percent of surface area of TPS particles. Finally, the concentration of starch dissolved in enzymatic medium was a key factor to control the generation of reducing sugars during enzymatic degradation process.

KEYWORDS

Polymer blends, morphology, enzymatic degradation.

INTRODUCCIÓN

La conciencia ambiental y el incremento en la generación de desperdicios derivados del petróleo, han establecido la necesidad de utilizar materiales biodegradables.¹ El almidón es un polímero natural, renovable y de bajo costo, el cual es un candidato potencial para la fabricación de materiales biodegradables.



A diferencia del almidón granular,² el almidón termoplástico (ATP)³ puede fluir y dar lugar a materiales con mejor balance de propiedades por medio del control de la morfología. El almidón está compuesto de una fracción lineal llamada amilosa unida por enlaces α -(1→4) y su contraparte ramificada denominada amilopectina, unida por enlaces α -(1→4) y α -(1→6) en donde la glucosa es la unidad polimérica repetitiva de ambas cadenas. Ambas fracciones son rápidamente hidrolizadas en su enlace glucosídico por las enzimas.⁴

Las principales enzimas involucradas en la hidrólisis del almidón son α -amilasas, β -amilasas, glucoamilasas, α -glucosidasas así como otras enzimas hidrolizantes.⁵ Los productos de la hidrólisis del almidón por estas enzimas son generalmente pequeñas fracciones de sacáridos tales como monosacáridos (glucosa), disacáridos (maltosa), y fracciones de oligosacáridos (dextrinas).⁶ Dichas fracciones de cadena poseen un grupo carbonilo en los extremos, el cual fácilmente es reducido por el reactivo de Fehling en presencia de álcali y calor, generando lo que se conoce como azúcares reductores.⁷

El mezclado de polietileno de baja densidad (LDPE) con almidón termoplástico resulta en materiales con mejor procesabilidad y menor sensibilidad del ATP a la humedad y en algunos casos un mejor balance de módulo y ductilidad.⁸ Sin embargo, la biodegradabilidad de las mezclas se ve drásticamente disminuida con el incremento en el contenido de polietileno.⁹ Se ha demostrado que la morfología juega un papel crucial en la biodegradabilidad de mezclas LDPE/ATP.¹⁰ Observándose cambios drásticos en la velocidad de degradación a tiempos cortos los cuales pueden ser atribuidos a la solubilización del plastificante y cadenas de almidón de menor tamaño. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios más a detalle para poder corroborar dichos fenómenos.

El conocimiento de los procesos de degradación de un polímero biodegradable, así como el entendimiento de los fenómenos que se ven involucrados dentro del mismo, pueden ser cruciales para el éxito en el uso de un biomaterial a mediano o largo plazo. Dentro de este marco de interés, el objetivo de esta investigación fue evaluar la degradación enzimática de ATP y mezclas de LDPE/ATP, así como los productos de

degradación por diversas técnicas de caracterización tales como cromatografía por exclusión de tamaño y colorimétricas. Del mismo modo el efecto de las condiciones de proceso fueron evaluados en materiales sin tratamiento enzimático.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Materiales

Se utilizó polietileno de baja densidad (LDPE133A; MFI = 0.22 g/10 min, Dow Chemical Co, EUA). Almidón de maíz (*Zea mays*) con aproximadamente 8.3% de humedad, fue obtenido de Arancia Corn Products (México). Agua destilada y glicerina (Proquisa S.A, México) se emplearon para gelificar y plastificar el almidón. Se utilizaron los preparados enzimáticos conocidos como Liquozyme Supra 2.2X (Novozymes, Dinamarca), el cual es una mezcla líquida de α -amilasas de *Bacillus licheniformis* (EC 3.2.1.1) y Dextrozyme DX 1.5X (Novozymes, Dinamarca) la cual es una mezcla balanceada de glucoamilasas de *Bacillus* expresada en *A. Niger* (EC 3.2.1.3) y pululanasa (EC 3.2.1.41). La densidad de las enzimas Liquozyme y Dextrozyme fue 1.26 y 1.17 g/ml, respectivamente, mientras que la actividad enzimática de estos preparados fue de 250 y 282 U/ml (Una unidad es equivalente a la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de glucosa por minuto a 100 °C, pH 5.5). La concentración de proteína fue de 43 y 84 Kg/m³ para Liquozyme y Dextrozyme, respectivamente y fue determinada por el método de Bronsted. Por último, el cóctel enzimático se preparó mezclando una parte de Liquozyme con una parte de Dextrozyme.

Preparación de mezclas LDPE/ATP

Se prepararon mezclas extruídas de ATP con 36% en peso de glicerina con LDPE en proceso de un solo paso. La composición de las mezclas LDPE/ATP varió desde 32 a 62% en peso de ATP. El sistema de extrusión y las condiciones de procesos han sido reportados en trabajos previos.¹¹⁻¹²

Análisis termogravimétrico (TGA)

La concentración de polietileno en las mezclas LDPE/ATP, se evaluó utilizando un equipo de análisis termogravimétrico (TGA) modelo 951 TA instrument

(EUA). La temperatura se varió desde 35 °C a 600 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Se utilizaron 20 mg de muestra para cada evaluación.

Morfología

Se obtuvieron superficies lisas de mezclas LDPE/ATP, mediante el corte criogénico utilizando un ultramicrotomo LEICA Ultracut modelo EMFCS (Suiza). Para mejorar el contraste, el ATP fue extraído con HCl 6N a 60 °C durante 48 h, después las muestras fueron lavadas varias veces con agua destilada y posteriormente secadas a vacío por 24 h a 60 °C. Las muestras secas fueron revestidas con una aleación de oro/paladio y observadas en un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JSM-820. El área de los dominios de ATP en mezclas LDPE/ATP fue medido utilizando un analizador de imágenes Sigma Scan Pro 5 System. En todos los casos al menos 3 campos de alrededor de 400 partículas fueron visualizados para cada mezcla con el fin de tener suficientes partículas para una evaluación estadística.

Degradación química

Especímenes de mezclas LDPE/ATP fueron molidas criogénicamente para obtener fracciones con diámetro de aproximadamente 3 mm. Con el fin de evaluar la accesibilidad de los dominios de almidón en estas mezclas, la degradación química se llevó a cabo con HCl 6N durante 72 h a 60 °C. Las mezclas extraídas fueron lavadas vigorosamente en varias ocasiones con agua destilada y secadas a vacío a 60 °C durante 24 h. El porcentaje de degradación química de las mezclas LDPE/ATP fue evaluada por pérdida de peso y expresado como porcentaje de accesibilidad.

Degradación enzimática

Se pesaron 0.5 g de muestra molida y se colocaron en matraces Erlenmeyer con 50 ml de buffer de acetato 0.2 M (pH 5.5). La degradación enzimática de las mezclas se inició adicionando a cada matraz el cóctel enzimático diluido 1:50 con 40 ppm de CaCl₂ para activar la enzima. Los matraces se incubaron a 37 °C bajo agitación constante de 30 rpm durante 72 h. Una vez transcurrido el tiempo de exposición de la muestra con los cócteles de enzimas,

se procedió a inactivar las enzimas con 50 mg de EDTA. Posteriormente, se separó la fase sólida de la solución por filtración con papel de fibra de vidrio (Whatman) y membrana de acetato de celulosa (0.45 µm). Se llevaron los sólidos a peso constante, y se cuantificó el porcentaje de degradación por pérdida de peso. Por último, el líquido del filtrado se congeló para estudios posteriores.

Análisis de los productos de degradación por azúcares reductores

Los productos de la hidrólisis enzimática fueron analizados mediante la detección de azúcares reductores de acuerdo al método de Nelson-Somogyi.¹³ En una prueba típica se agregaron 10 µl del líquido filtrado, y se diluyeron (1:25) en 240 µl de buffer de acetato (pH 5.5), adicionándoles 250 µl del reactivo de Somogyi. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 10 min en agua hirviendo, y se dejó enfriar en agua con hielo por 5 min. Se agregaron 250 µl de reactivo de Nelson y se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 30 min. Una vez concluido el tiempo de reposo, se le añadieron 4 ml de agua y se tomaron lecturas de absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro UV/visible Multispec-1501 (EUA). Los valores de absorbancia de la muestra se ajustaron a una curva de calibración que se elaboró a partir de una solución de concentración conocida de glucosa (500 ppm).

Cromatografía de filtración en gel

Se conectaron cuatro columnas (5 ml de gel cada una; Sephadex G25, Hi Trap Desalting Amersham Biosciences, Suiza) equilibrándolas con 40 ml de agua desionizada a un equipo Acta Prime (Amersham Biosciences, Suiza) con detector UV visible UPC-900 con rango de absorbancia de 0.01-5.0m AU acoplado a un software (Unicorn) para la adquisición de datos. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: volumen de muestra 0.5 ml, volumen de elución 30 ml, velocidad de 1 ml/min, recolectándose fracciones de 2 ml de agua desionizada.

Análisis de azúcares totales y glucosa

La detección de azúcares totales se llevó a cabo por el método colorimétrico de Doboys.¹⁴ De manera

paralela, se llevó a cabo este procedimiento con una solución de buffer de acetato sin enzima como control. La cantidad de glucosa en las muestras fue determinada por un kit de glicemia enzimática (Weiner lab, Argentina). Se adicionaron 50 μ l de muestra en un tubo de ensayo y, posteriormente, se añadieron 950 μ l del reactivo de trabajo dejándose reposar por 20 min. Por último, se tomó lectura a 505 nm y se ajustaron los valores de absorbancia a una curva de calibración con glucosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología de mezclas LDPE/ATP

Las mezclas LDPE/ATP desarrollan una morfología discreta donde el LDPE es la matriz (figura 1). A 32% en peso de ATP se logra distinguir una gran población de partículas pequeñas de ATP con un rango de tamaño de partícula de 2 a 5 μ m, las cuales se encuentran dispersas alrededor de algunas partículas mas grandes con tamaño de entre 10 y 20 μ m (figura 1a). Por otra parte, las micrografías de las mezclas que contienen 62% en peso de ATP muestran una interconexión de partículas tan grande que se extiende mas allá de la superficie microtomada de aproximadamente 1 mm de longitud (figura 1b). Se realizó el cálculo del área relativa de la fase de almidón con respecto al área total en las micrografías de la figura 1. La mezcla LDPE/ATP compuesta por 32% de ATP abarca el 18% de la superficie, mientras que la mezcla que contiene 62% de almidón ocupa el 34% del área superficial.

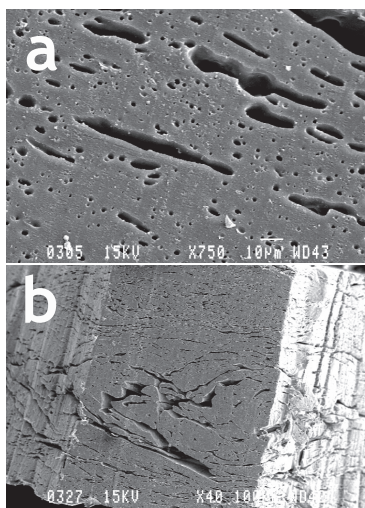


Fig. 1. Micrografías de mezclas LDPE/ATP en dirección longitudinal: (a) 32%, (b) 62% en peso de ATP.

DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE MEZCLAS LDPE/ATP

Porcentaje en pérdida de peso

En trabajos previos¹⁰⁻¹¹ se llevaron a cabo estudios de la continuidad de fase almidón de mezclas de LDPE/ATP hidrolizadas por medio de la exposición a HCl 6N a 60 °C durante 48 h. El porcentaje de continuidad fue dependiente de la concentración de almidón y de la viscosidad de la matriz de LDPE. Las mezclas de LDPE/ATP preparadas con 32% y 62% de ATP presentaron porcentajes de continuidad de 66% y 100%, respectivamente.

El efecto de la exposición a un cóctel enzimático sobre la pérdida de peso del ATP y sus mezclas con LDPE se muestra en la figura 2. En esta figura, los valores de pérdida de peso se reportan como una relación entre el valor experimental calculado durante la degradación enzimática y el valor máximo que se puede extraer por degradación química.

De manera paralela, se evaluó el efecto de la exposición al medio en ausencia de enzimas sobre la pérdida de peso del ATP y de las mezclas LDPE/ATP 38:62 y 68:32. Como se esperaba, el ATP presenta una mayor pérdida de peso ya que este se hincha al ser expuesto al medio acuoso. A 72 h de exposición se observó una pérdida de 30% para el ATP, mientras que en las mezclas LDPE/ATP con 38:62 y 68:32 se perdió 15% y 8%, respectivamente. En el caso de las mezclas, la pérdida de peso es menor debido al impedimento físico que impone la matriz de LDPE para el hinchamiento del ATP, lo cual resulta en una difusión más lenta de la glicerina y otros compuestos solubles del almidón. Además, existen diferencias significativas al comparar los porcentajes de pérdida de las mezclas LDPE/ATP. En la mezcla LDPE/ATP 38:62, el almidón ocupa 34% del área superficial con respecto al área total de la mezcla y permite la extracción de 15% de material soluble del ATP, mientras que la mezcla con 32% de ATP ocupa un área superficial de 18% y permite la solubilización de solamente 8% de glicerina y fracciones de bajo peso molecular del polisacárido.

Se ha reportado que la degradación enzimática es muy similar a la degradación química.¹⁰ Por esta razón, los valores de degradación enzimática fueron puestos en función de la concentración máxima de extracción. Esto implica que el porcentaje de pérdida

por degradación enzimática debe tender al 100% para todos los casos y, por lo tanto, la evaluación de la velocidad de degradación es más acertada. A tiempos cortos de exposición se observa que la velocidad de degradación es dependiente de la concentración de almidón termoplástico en la superficie de la muestra, por ejemplo, a 3 h se observa una degradación de 50%, 43% y 31% para las muestras de ATP y mezclas con 62% y 32% de ATP, respectivamente. A medida que pasa el tiempo de exposición, las muestras de ATP se degradan aún más rápidamente que las mezclas de LDPE/ATP, hasta llegar al 100% entre las 24 y 36 h. Por otra parte, a medida que transcurre el tiempo de exposición al ataque enzimático, la velocidad de degradación de las mezclas tiende a igualarse hasta ser igual después de 24 h de exposición.

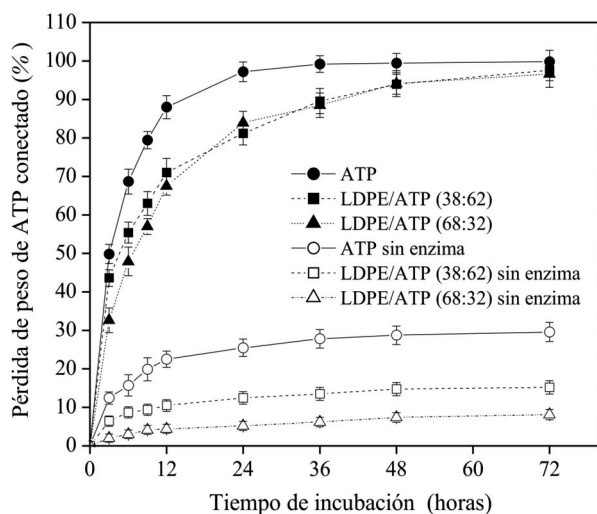


Fig. 2. Cinética de degradación enzimática, expresado como porcentaje en pérdida de peso con respecto a la concentración máxima de almidón susceptible a la extracción: ATP (●), LDPE/ATP con (■) 62% y (▲) 32% de ATP. Los símbolos en blanco representan el tratamiento sin enzima.

Análisis de azúcares reductores de los productos de degradación en solución

La técnica de evaluación de azúcares reductores consiste en modificar un extremo de la cadena de almidón de tal forma que se pueda cuantificar el número de extremos de cadena por medio de espectroscopía UV. De esta forma, el aumento en la cantidad de azúcares reductores implica el rompimiento de las cadenas, por ejemplo, como resultado de la degradación enzimática o la

degradación termomecánica durante el proceso de extrusión.

En la figura 3, se observa la producción de azúcares reductores en solución de ATP y mezclas LDPE/ATP con 32% y 62% en peso de ATP. Al igual que en la figura anterior, los valores de azúcares reductores fueron normalizados con respecto a la concentración máxima de almidón hidrolizable restando, la glicerina presente en el ATP. En el caso de las muestras sin tratamiento enzimático se observa que hay una importante diferencia entre la concentración de azúcares reductores que se detecta para las muestras de ATP y las mezclas de LDPE/ATP. El ATP muestra un porcentaje de azúcares reductores con respecto a la glucosa que teóricamente se puede producir a partir del almidón susceptible de hidrólisis de 32%, mientras que las mezclas presentan alrededor de 20%. Esta diferencia puede relacionarse, como ya se mencionó, al mayor hinchamiento del ATP en la solución acuosa.

Un hecho que llama la atención es la gran cantidad de azúcares reductores producida en la mezcla LDPE/ATP compuesta por 32% de ATP (28%), la cual es mayor a la mezcla que contiene 62 de ATP (24%). Ya que la concentración de ATP extraído (glicerina + fracciones de almidón solubles) en la mezcla LDPE/ATP (38:62) fue el doble de la mezcla con 32% de ATP, además el incremento en azúcares reductores en la segunda es debido a la mayor degradación termomecánica que sufre el almidón, la cual lleva a la dextrinización y a la producción de glucosa.¹⁵

Al incubar las muestras de almidón con el cóctel enzimático, las enzimas provocan la ruptura de las cadenas del almidón tanto en la parte sólida como en las fracciones que están en solución. Sorpresivamente, el porcentaje de azúcares reductores obtenido después de 72 h de exposición al cóctel enzimático para todas las muestras fue alrededor de 90%. Además, la velocidad de degradación de las cadenas de almidón es más rápida en el caso de la mezcla LDPE/ATP (68:32) que en el ATP y la mezcla (38:62). Los valores de azúcares reductores para los materiales evaluados fueron, por ejemplo, 32% y 17% a las 3 h de exposición para las mezclas LDPE/ATP con 32% y 62% de ATP, respectivamente. Considerando que el almidón

hidrolizado y la glicerina se incorporan a la solución a la misma velocidad, la cantidad de almidón presente en la solución a las 3 h de exposición fue alrededor de 20 y 85 mg (de los 500 mg de mezcla expuestos) para las mezclas LDPE/ATP con 32% y 62% de ATP, respectivamente.

Ya que el ataque enzimático se da principalmente en la solución, la presencia de una menor cantidad de almidón en la solución implica que hay una mayor cantidad de enzima disponible para la hidrólisis de las cadenas de polisacárido. Además, la determinación de azúcares reductores es selectiva para los polisacáridos como el almidón o sus componentes hidrolizados presentes en la solución. En el caso de las mezclas, la velocidad de degradación presenta una reducción importante alrededor de las 36 h de degradación, mientras que la velocidad de hidrólisis del ATP presenta una disminución considerable alrededor de las 24 h. Este hecho puede estar relacionado con la reducción de la actividad enzimática debido a la saturación de medio con productos de la hidrólisis.¹⁶⁻¹⁷

Fraccionación de los productos de degradación en solución

La degradación enzimática de las cadenas de almidón trae como consecuencia la reducción del

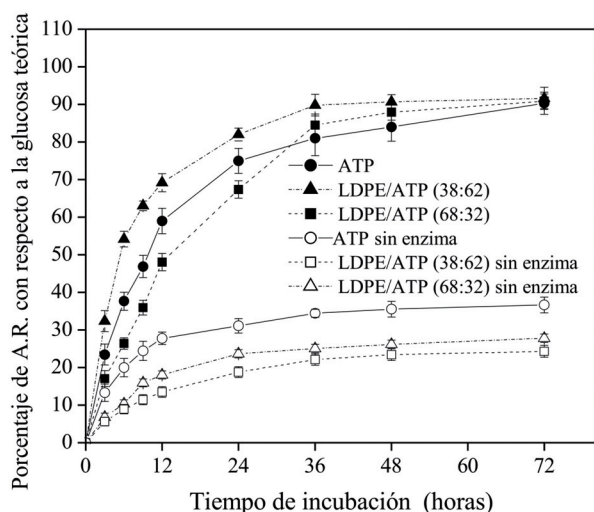


Fig. 3. Porcentaje de azúcares reductores liberados con respecto a la cantidad máxima teórica de almidón en solución: ATP (●), LDPE/ATP con (■) 62% y (▲) 32% de ATP. Los símbolos en blanco representan el tratamiento sin enzima.

tamaño de las cadenas de polisacárido, dando lugar a la producción de oligosacáridos, dextrinas y finalmente glucosa. Los productos de la hidrólisis enzimática del almidón fueron fraccionados por cromatografía de filtración en gel.

Es bien sabido que durante los procesos de cromatografía de exclusión por tamaño los compuestos de alto peso molecular salen en primer lugar y a medida que el peso molecular va disminuyendo los tiempos de elusión van aumentando hasta que a los tiempos más largos salen los monómeros, dímeros o trimeros. Las diferentes fracciones obtenidas fueron caracterizadas utilizando la técnica de azúcares totales y el contenido de glucosa. La técnica de azúcares totales consiste en la descomposición de las cadenas de almidón hasta glucosa y determinar la concentración de azúcar.

En la figura 4 se presenta la concentración de azúcares totales y glucosa en función del tiempo de elusión durante la fraccionación de los componentes solubilizados del ATP y la mezcla LDPE/ATP (38:62).

En el caso de la evaluación de los blancos se observa la presencia de glucosa y una fracción de azúcares totales a los 20 min de elusión. El contenido de glucosa es menor que el de azúcares totales, lo cual implica la presencia de cadenas de 2 o más unidades monoméricas. Las muestras expuestas al cóctel enzimático por 3 h muestran la presencia de cadenas de almidón a los 6 min de elusión y las fracciones de glucosa y cadenas de bajo peso molecular se presentan a tiempos de elusión de 16 - 20 min.

Finalmente, a las 72 h de hidrólisis enzimática se observa la presencia de cadenas de alto peso molecular (6 min de elusión), cadenas de mediano peso molecular (12 min) y compuestos de bajo peso molecular (de 14 - 20 min). Es importante resaltar que en la mezcla LDPE/ATP (38:62) expuesta 72 h al ataque enzimático la concentración de glucosa y azúcares reductores es muy similar. Al igual que la mayor velocidad de degradación enzimática de la mezcla LDPE/AP (68:32), la transformación de una mayor cantidad de almidón a glucosa en el caso de la mezcla compuesta con 62% de ATP, puede estar relacionada con la menor concentración de polisacárido en solución.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió el efecto de la morfología sobre el proceso de degradación enzimática de mezclas de LDPE/ATP. El área superficial que ocupa el almidón en la superficie de las mezclas tiene una influencia importante sobre el porcentaje de pérdida de peso de los materiales expuestos a la solución buffer, en ausencia de enzima y sobre la velocidad de hidrólisis enzimática del almidón. En la mezcla compuesta con 62% de ATP, el almidón ocupa 34% del área superficial y permite la extracción de 15% de material soluble del ATP, mientras que la mezcla con 32% de ATP ocupa un área superficial de 18% y permite la solubilización de solamente 8%. De igual forma, a 3 h de exposición al ataque enzimático se

observa una pérdida de peso de 43% en la mezcla con 62% de ATP, mientras que en la mezcla con 32% se alcanza una pérdida de 31%.

El análisis de la generación de azúcares reductores muestra que, sorpresivamente, la mayor velocidad de hidrólisis del almidón se da en las mezclas compuestas con 32% de ATP. A 3 h de exposición al cóctel enzimático de la mezcla que contiene 32% de ATP se observa una generación de azúcares reductores del 30%, mientras que la mezcla que contiene 62% de ATP genera solamente 17% de azúcares reductores. La mayor generación de azúcares reductores se debe a la presencia de un mayor número de unidades enzimáticas por mg de almidón disuelto en el medio.

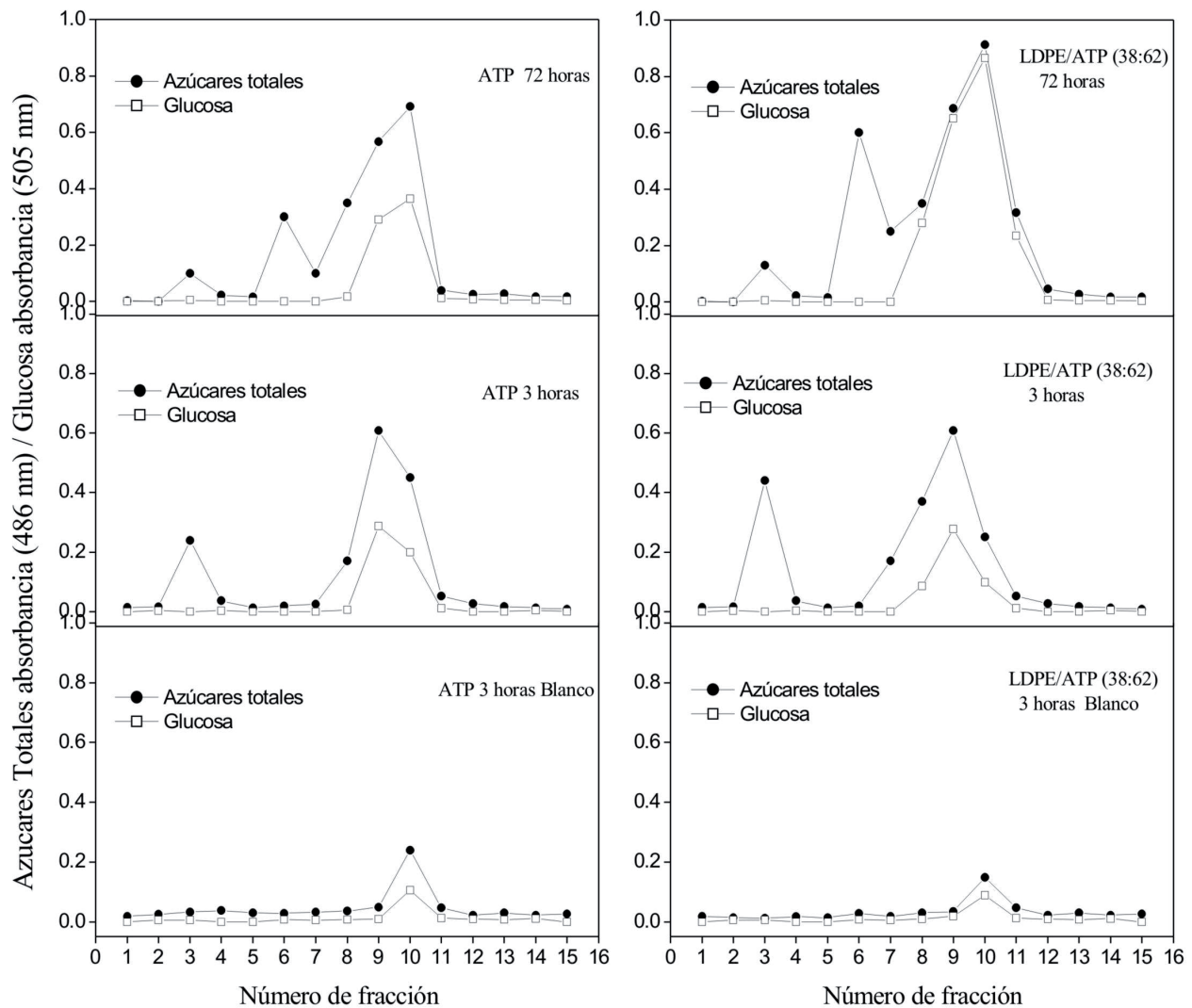


Fig. 4. Análisis de azúcares totales y glucosa del producto de la hidrólisis enzimática del almidón fraccionado por cromatografía para ATP puro (izquierda) y mezclas LDPE/ATP con 62% de ATP (derecha).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). El señor Tena agradece al Centro de Investigación en Química Aplicada por el apoyo brindado durante sus estudios de Doctorado. Los autores agradecen también a la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC por las facilidades otorgadas para la obtención de las enzimas así como también ayuda brindada para la realización y el monitoreo de las pruebas enzimáticas. Del mismo modo se agradece a la Chemical Engineering Department de la École Polytechnique de Montreal por el apoyo para la caracterización morfológica por SEM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bastioli, C. Starch-polymer composites. En: Degradable polymer. Principles and applications (G. Scott ed.) Chapman & Hall, London. (1995) Pp. 113-137.
2. Willet, J. L. Mechanical properties of LDPE/Granular starch composites. *J Appl Polym Sci* (1994) 54, 1685-1695.
3. St-pierre, N., Favis, B.D., Ramsay, J.A. y Verhoogt H. Processing and characterization of thermoplastic starch/polyethylene blends. *Polymer* (1997) 38, 647-655.
4. Leach, H.W. En: Starch chemistry and technology. (Academic Science eds). New York (1984) Pp. 291-294.
5. Reis, R.L., Cunha, A.M. Starch and starch based thermoplastics. En: Encyclopedia of Materials Science and Technology (Pergamon y Elsevier eds.) Amsterdam (2001) Pp. 8810-8816.
6. Hoover, R., Zhou, Y. In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes. *Carbohydrate Polymer* (2003) 54, 401-417.
7. Pigman, W. y Goepf, R. M. Chemistry of carbohydrates. Academic Press (1998) pp. 216
8. Rodríguez-González, F.J., Ramsay, B.A. y Favis, B.D. Influence of melt drawing on the morphology of the one and two-step processed LDPE/Thermoplastic starch blends. *Advances in Polymer Technology* (2003) 22, 297-305.
9. Bikiaris, D., Prinos, J., Koutsopoulos, K., Vouroutzis, N., Pavlidou, E., Frangis, N., y Panayiotu, C. LDPE/plasticized starch blends containing PE-g-MA copolymer as compatibilizer. *Polym. Degrad. Stab.* (1998) 59, 287.
10. Tena-Salcido, C.S., Rodríguez-González, F.J., Méndez-Hernández, M.L. Contreras-Esquivel J.C. Effect of Morphology on the Biodegradation of Thermoplastic Starch in LDPE/TPS Blends. *Polymer bulletin* (2007) 60, 677-688.
11. Rodríguez-González, F.J., Ramsay, B.A. y Favis, B.D. High performance LDPE/Thermoplastic starch blends: A sustainable alternative to pure polyethylene. *Polymer* (2003) 44, 1517-1526.
12. Tena-Salcido, C.S., y Rodríguez-González F.J. The influence of relative humidity on the mechanical properties of LDPE/TPS blends En: XV International Materials Research congress AMC, Cancún, Quintana Roo, México (2006) CD.
13. Nelson, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* (1944) 47, 100-107.
14. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A, Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* (1956) 28, 350-356.
15. Gómez, M.H. y Aguilera, J.M. A physicochemical model for extrusion of corn starch. *Journal of Food Science* (1984) 49, 40-43.
16. Araujo, M.A., Cunha, A.M., Mota, M. Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in protheses: Identification of the degradation products in solution. *Biomaterials* (2004) 25, 2687-2693.
17. Vikman, M.; Hulleman, H. D.; Van der Zee, M.; Myllärinen, P.; y Feil, H. Morphology and enzymatic degradation of thermoplastic starch/polycaprolactone blends. *J. Appl. Polym. Sci.*, (1999) 74, 2594.