



## Películas antibacterianas de poli(3-hidroxi butirato) (PHB)

Mayte Milenka Quispe<sup>1</sup>, María Emilia Villanueva<sup>2</sup>, Guillermo Javier Copello<sup>3</sup>,  
Olivia Valeria López<sup>1,4</sup>, Marcelo Armando Villar<sup>1,5</sup>

1. Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga Km 7, Bahía Blanca 8000, Argentina.
2. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de Luján, Luján 6700, Argentina.
3. Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco, IQIMEFA (UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires 1113, Argentina.
4. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, Bahía Blanca 8000, Argentina
5. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, Bahía Blanca 8000, Argentina.

\*E-mail: [olivialopez@plapiqui.edu.ar](mailto:olivialopez@plapiqui.edu.ar)

### PALABRAS CLAVES

Poli(3-hidroxi butirato)  
Sulfato de cobre  
Películas  
Capacidad antibacteriana

### RESUMEN

En este trabajo se obtuvieron películas por mezclado en fundido y termocompresión a partir de poli(3-hidroxi butirato) (PHB) con Irganox 1010 (0,3 %, p/p<sub>PHB</sub>) como antioxidante, tributirato de glicerol (20 %, p/p<sub>PHB</sub>) como plastificante y sulfato de cobre (II) pentahidratado (0,5 - 7,5 %, p/p<sub>PHB</sub>) como antimicrobiano. La incorporación del antimicrobiano incrementó la rugosidad de la superficie de las películas. Los materiales que contenían sulfato de Cu (II) presentaron menor ductilidad y resistencia mecánica debido al tamaño micrométrico de los cristales. La incorporación de 0,5 % del antimicrobiano permitió incrementar la WVP debido al elevado grado de hidratación de la sal; sin embargo, concentraciones mayores (2,5 - 7,5 %) redujeron esta propiedad por el incremento de la tortuosidad. Si bien los materiales presentaron capacidad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -), se apreciaron diferencias atribuidas a la pared celular de estas bacterias. Así, se demostró que es posible obtener películas antibacterianas de PHB a partir de la incorporación de una sal de cobre que podrían utilizarse para envases de alimentos, cosméticos o farmacéuticos como así también para dispositivos biomédicos.

## Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) films with antibacterial properties

### KEYWORDS

Poly(3-hydroxybutyrate)  
Copper sulfate  
Films  
Antibacterial capacity

### ABSTRACT

In this work, films of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) with Irganox 1010 (0.3%, w/p<sub>PHB</sub>) as antioxidant, glycerol tributyrates (20%, w/p<sub>PHB</sub>) as plasticizer, and copper (II) sulfate pentahydrate (1 - 7.5%, w/p<sub>PHB</sub>) as antimicrobial were obtained by melt mixing and thermocompression. The incorporation of the antimicrobial increased the roughness of films surface. The materials containing Cu (II) sulfate presented lower ductility and mechanical resistance due to the crystals micrometric size. The incorporation of 0.5 % of the antimicrobial increased the WVP due to the high degree of hydration of the salt; however, higher concentrations (2.5 - 7.5 %) reduced this property due to an increased tortuosity. Although the materials presented antibacterial capacity against *Staphylococcus aureus* (Gram +) and *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -), differences attributed to cell wall of the bacteria were observed. Thus, it was revealed that it is possible to obtain antibacterial PHB films, from the incorporation of a copper salt, that could be used for food, cosmetic or pharmaceutical packaging as well as for biomedical devices.

### 1. Introducción

La inadecuada disposición final de los materiales de uso masivo derivados del petróleo tales como

envases de alimentos, bebidas, cosméticos y fármacos, como así también dispositivos biomédicos e insumos agropecuarios provoca un gran impacto ambiental. Esto se atribuye principalmente a la

generación y acumulación de materiales no biodegradables, como por ejemplo los denominados microplásticos que se encuentran contaminando hábitats acuáticos, terrestres y aeroterrestres (Castañeta et al., 2020). Una alternativa para minimizar el impacto ambiental que genera el uso y la mala disposición de los materiales de origen petroquímico, son los biomateriales de origen renovable y biodegradables (Miteluț et al., 2019; Arancibia et al., 2014). Sin embargo, pese a ser sustentables, estos materiales aún no se utilizan de forma masiva debido principalmente a su elevado costo, deficientes propiedades mecánicas como la fragilidad y difícil procesamiento, en comparación con los materiales derivados del petróleo (Montes et al., 2016).

Actualmente, el desarrollo de materiales que no sólo se obtengan de recursos renovables y sean biodegradables sino también que posean capacidad antibacteriana, resulta de gran interés para la comunidad científica y el sector industrial. El poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) es uno de los biopolímeros más estudiados y además posee propiedades mecánicas similares a algunos polímeros sintéticos. Sin embargo, a diferencia de otros biopolímeros como el quitosano, no posee actividad antibacteriana. En 2008, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos reconoció al cobre como el primer metal antimicrobiano. Se ha demostrado en ensayos in vitro que sobre superficies sólidas de cobre se puede eliminar el 99,9 % de los microorganismos (Prado et al. 2012). La actividad antibacteriana del cobre se atribuye principalmente a la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  que afectan la integridad de la membrana/pared bacteriana. Posteriormente, generan estrés oxidativo intracelular y modifican el ADN, resultando

finalmente en la muerte de los microorganismos (Grass et al., 2011; Vincent et al., 2018). Por ello, una manera de potenciar el uso del PHB es otorgarle propiedades antibacterianas a partir de la adición de sales de cobre.

El objetivo de este trabajo fue obtener películas flexibles a partir de PHB con capacidad antibacteriana. Se evaluó el efecto de la incorporación de tributirato de glicerol como plastificante y sulfato de cobre (II) pentahidratado como agente antibacteriano sobre la microestructura y las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al vapor de agua de las películas de PHB. Además, se realizaron estudios para evaluar la capacidad antibacteriana de los materiales desarrollados testeando bacterias Gram positivas y Gram negativas.

## 2. Materiales y métodos

### Materiales

El poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) se adquirió de Biomer® (Alemania). Los aditivos utilizados fueron tributirato de glicerol (TBG, 98,5 % de pureza, Sigma Aldrich, Suiza) como plastificante, Irganox® 1010 (I, 98,0 % de pureza, Sigma Aldrich, Suiza) como antioxidante y sulfato de cobre (II) pentahidratado (Cu, 98,0 % pureza, Biopack, Argentina) como agente antibacteriano.

### Obtención de las películas

Se prepararon diferentes formulaciones de PHB, I, TBG y Cu, según se muestra en la Tabla 1. Cabe destacar que, las concentraciones de los diferentes aditivos se encuentran expresadas en porcentaje en base PHB (% p/p<sub>PHB</sub>).

**Tabla 1.** Formulaciones de películas a base de PHB, Irganox 1010 (I), tributirato de glicerol (TBG) y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Cu).

Formulación	Irganox 1010 (I) (%, p/p <sub>PHB</sub> )	Tributirato de glicerol (TBG) (%, p/p <sub>PHB</sub> )	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu) (%, p/p <sub>PHB</sub> )
PHB-I-0Cu	0,3	-	-
PHB-I-0,5Cu	0,3	-	0,5
PHB-I-2,5Cu	0,3	-	2,5
PHB-I-5Cu	0,3	-	5,0
PHB-I-7,5Cu	0,3	-	7,5
PHB-I-0Cu <sub>TBG</sub>	0,3	20	-
PHB-I-0,5Cu <sub>TBG</sub>	0,3	20	0,5
PHB-I-2,5Cu <sub>TBG</sub>	0,3	20	2,5
PHB-I-5Cu <sub>TBG</sub>	0,3	20	5,0
PHB-I-7,5Cu <sub>TBG</sub>	0,3	20	7,5

Las muestras se procesaron por mezclado en fundido empleando una mezcladora Brabender Plastograph (Alemania) a 180 °C y 60 rpm, durante 15 min. Las muestras procesadas se trituraron y se utilizaron para la obtención de las películas por termocompresión empleando una prensa hidráulica (5 kg cm<sup>-2</sup>, 195 °C y 15 min). El espesor se midió utilizando un calibre digital electrónico MAX-CAL (Fowler & NSK, Japón), tomando 5 mediciones en posiciones al azar para cada una de las muestras y promediando los valores obtenidos.

#### Caracterización de las películas

Para el estudio de la microestructura, las películas se crio-fracturaron empleando N<sub>2</sub> líquido, se montaron sobre tacos de aluminio y se metalizaron usando una metalizadora de plasma de Argón. La morfología de las secciones transversales se estudió mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), utilizando un microscopio LEO EVE 40 XVP con un detector de electrones secundario. Además, utilizando un Sistema de Microanálisis de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS) Oxford X-Max 50, acoplado al microscopio, se realizó un microanálisis para obtener información sobre la composición química elemental de una pequeña área de las muestras estudiadas.

Las microfotografías de las superficies de las películas se obtuvieron mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), utilizando un microscopio láser focal Carl Zeiss (Alemania). Se fijó una muestra de 2 × 2 mm sobre una cinta adhesiva de doble faz y se escanearon diferentes áreas (10 × 10 μm<sup>2</sup> a 500 × 500 μm<sup>2</sup>) para determinar la rugosidad superficial media (Ra).

El estudio de las propiedades mecánicas se llevó a cabo a partir de ensayos de tracción en un equipo Instron Tensile Testing Instrument modelo 3369 (UK), utilizando una velocidad de 5 mm/min y una celda de carga de 1 kN. A partir de las curvas de tensión en función de la deformación, se calcularon la resistencia máxima a la tracción (σ<sub>m</sub>), el módulo de Young (E) y el alargamiento a la rotura (ε<sub>B</sub>), de acuerdo con la norma ASTM D882-9. Se ensayaron al menos 10 especímenes de cada una de las formulaciones estudiadas.

La permeabilidad al vapor de agua (WVP, siglas en inglés) se determinó empleando un permeador Permatran W3/33 (Mocon Inc., USA), de acuerdo al método estándar ASTM F-1249. Las medidas se

llevaron a cabo a 25 °C, empleando un área de exposición de 5 cm<sup>2</sup>. Los ensayos se realizaron por duplicado.

La estabilidad térmica se evaluó mediante análisis termogravimétrico (TGA) utilizando una balanza termogravimétrica TA Instrument Discovery Series (USA). Las muestras (~10 mg) se calentaron de 25 a 350 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>, en atmósfera de nitrógeno (20 mL min<sup>-1</sup>). Se registraron las curvas de porcentaje de masa en función de la temperatura y se obtuvieron la temperatura de onset (T<sub>d onset</sub>) y la temperatura máxima de descomposición (T<sub>d máx</sub>) a partir de la curva de la primera derivada (DTGA), de acuerdo con la metodología propuesta por Seoane et al. (2018).

Se realizaron ensayos de difusión en agar LB para evaluar la actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) y *Staphylococcus aureus* (Gram +). Las colonias de las bacterias obtenidas de un cultivo de 12 h se suspendieron en caldo LB y la concentración se ajustó a 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Luego, se extendieron 200 μL de esta suspensión en placas de agar LB. Las muestras de películas (discos de 0,5 cm de diámetro) se desinfectaron con 1 mL de etanol al 70 % y se utilizaron para el ensayo de eficacia antibacteriana después de lavar tres veces con agua esterilizada. A continuación, las muestras se dejaron reposar sobre el medio inoculado y después de la incubación a 37 °C durante 24 h, se midió el halo de inhibición.

### 3. Resultados y Discusión

#### Microestructura

Las películas estudiadas presentaron secciones transversales homogéneas, observándose en las muestras que contenían sulfato de cobre la presencia de los cristales de la sal embebidos en la matriz polimérica. A modo de ejemplo, en la Figura 1 se muestran las microfotografías SEM y el espectro EDS de la sección transversal de la película PHB-I-0,5Cu<sub>TBG</sub>. En las imágenes SEM (Figuras 1A y 1B) se observan los cristales de la sal de cobre que presentaron tamaños que oscilaron entre 25 y 50 μm.

La coloración rojiza de los cristales es un indicativo de que los mismos están conformados por una cantidad significativa de cobre (Figura 1A). De acuerdo con esta observación, el análisis elemental de los cristales por EDS mostró picos asociados al

cobre elemental (Cu), además de pequeñas trazas de oxígeno (O) que sugiere una oxidación parcial del

cobre y la presencia de azufre (S) asociado a iones sulfato (Figura 1C).

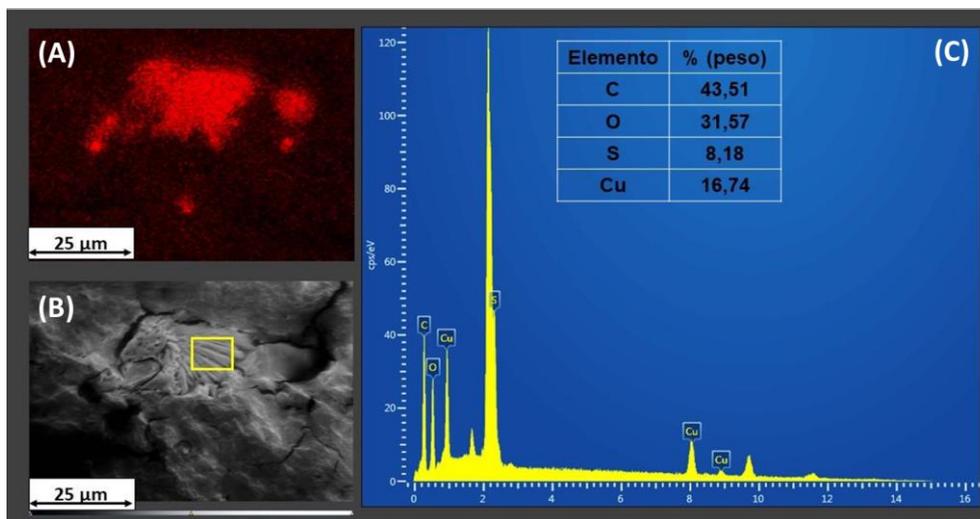


Figura 1. (A) y (B) Micrografías SEM de películas de PHB-I-0,5CuTBG. (C) Espectro EDS de la sección recuadrada en amarillo en la imagen (B).

La rugosidad es una propiedad importante de las películas poliméricas, especialmente para ciertas aplicaciones donde la adherencia de los materiales es relevante. La Figuras 2A y 2B corresponden a micrografías AFM en 3D de películas de PHB plastificadas con TBG, sin y con sulfato de cobre al 2,5 %. La rugosidad de las películas de PHB-I-0CuTBG resultó ser  $45 \pm 8$  nm, un valor significativamente menor al informado por Chan et al. (2011) para películas a base de PHB. La incorporación de sulfato

de cobre generó un aumento notable en la rugosidad de las películas, siendo  $105 \pm 14$  nm para las películas de PHB-I-2,5CuTBG. Este incremento podría atribuirse a la presencia de microcristales de sal en la superficie de las películas. De acuerdo con esta observación, un estudio similar demostró que la incorporación de cargas minerales aumentó notablemente la rugosidad media de los materiales basados en PHB (Toloue et al., 2019).

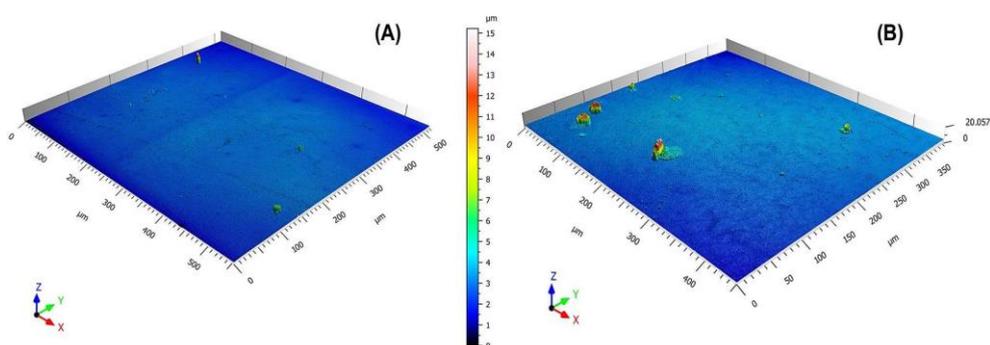


Figura 2. Imágenes AFM en 3D de películas de: (A) PHB-I-0Cu y (B) PHB-I-2,5CuTBG.

### Degradación térmica

En Tabla 2 se muestran las temperaturas de onset ( $T_{donset}$ ) y de máxima degradación térmica ( $T_{dmax}$ ) de todas las formulaciones estudiadas. En general, se observa que la presencia del plastificante (TBG) y la

incorporación de la sal de cobre provocaron una leve disminución de la temperatura de onset y de máxima degradación térmica. En el caso de la adición del TBG, la presencia de los grupos ésteres del plastificante podrían promover reacciones de

degradación del PHB y reducir la  $T_{d_{onset}}$  y la  $T_{d_{máx}}$  (Seoane et al., 2018). En general, cuando se incorporan compuestos inorgánicos a matrices poliméricas se evidencia una mejora de la estabilidad térmica de los materiales compuestos. El hecho de que la presencia de la sal de cobre no tuviera ese efecto sobre la estabilidad térmica de las formulaciones estudiadas podría atribuirse a una baja compatibilidad entre la matriz polimérica y las partículas minerales.

**Tabla 2.** Temperaturas de onset ( $T_{d_{onset}}$ ) y de máxima degradación térmica ( $T_{d_{máx}}$ ) de películas de PHB con TBG y sulfato de cobre (II) pentahidratado.

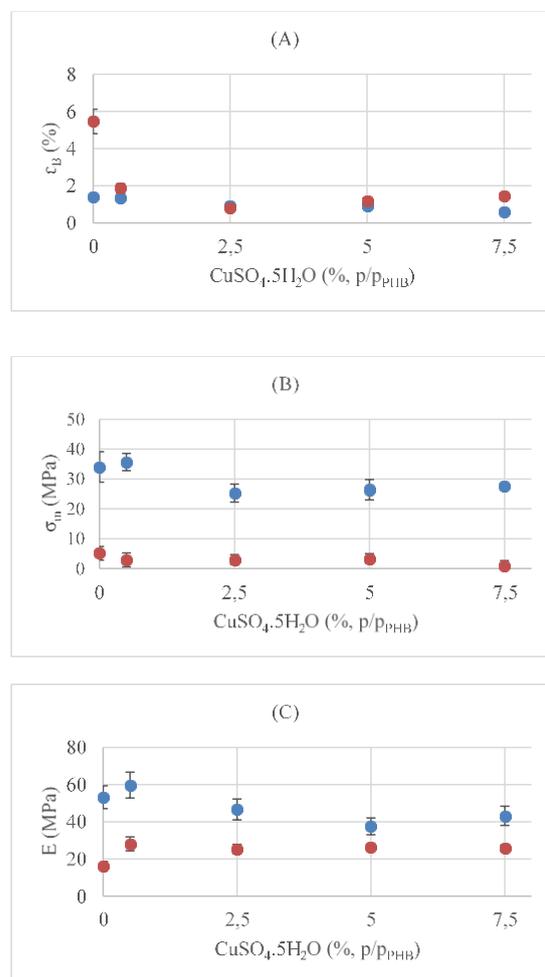
Formulación	$T_{d_{onset}}$ (°C)	$T_{d_{máx}}$ (°C)
PHB-I-0Cu	271,5	290,0
PHB-I-0,5Cu	270,2	284,9
PHB-I-2,5Cu	274,6	287,6
PHB-I-5Cu	270,3	286,0
PHB-I-7,5Cu	272,7	287,7
PHB-I-0Cu <sub>TBG</sub>	275,1	286,9
PHB-I-0,5Cu <sub>TBG</sub>	266,0	284,7
PHB-I-2,5Cu <sub>TBG</sub>	267,8	283,8
PHB-I-5Cu <sub>TBG</sub>	269,3	283,3
PHB-I-7,5Cu <sub>TBG</sub>	267,2	283,9

En el caso de la adición del TBG, la presencia de los grupos ésteres del plastificante podrían promover reacciones de degradación del PHB y reducir la  $T_{d_{onset}}$  y la  $T_{d_{máx}}$  (Seoane et al., 2018). En general, cuando se incorporan compuestos inorgánicos a matrices poliméricas se evidencia una mejora de la estabilidad térmica de los materiales compuestos. El hecho de que la presencia de la sal de cobre no tuviera ese efecto sobre la estabilidad térmica de las formulaciones estudiadas podría atribuirse a una baja compatibilidad entre la matriz polimérica y las partículas minerales.

### Propiedades mecánicas

La incorporación de partículas minerales a matrices biopoliméricas suele ser una estrategia para superar ciertas limitaciones como la baja rigidez y resistencia mecánica. Sin embargo, los efectos sobre las propiedades finales de los materiales compuestos dependen de varios factores tales como el tamaño de las partículas, la concentración del relleno y la adhesión interfacial entre partículas y matriz (Ren et al., 2009). La Figura 3 muestra el efecto de la adición de las diferentes concentraciones de sulfato de cobre estudiadas sobre las propiedades mecánicas de las películas de PHB sin plastificar y plastificadas

con TBG. Un aumento en la concentración de la sal de cobre condujo a una disminución de la elongación a la rotura y de la resistencia mecánica de las películas (Figura 3A y 3B). Estos cambios podrían deberse principalmente a las dimensiones micrométricas de las partículas añadidas (entre 25 y 50  $\mu\text{m}$ , aproximadamente). La máxima resistencia a la tracción aumenta cuando disminuye el área superficial de las partículas, como en el caso de la incorporación de nanopartículas que proporcionan una distribución eficiente de la tensión en la matriz polimérica (Fu et al., 2008; Mittal, 2009). Los resultados obtenidos sugieren que, para mejorar las propiedades mecánicas de las películas de PHB mediante la adición de sulfato de cobre (II), sería necesario realizar una reducción del tamaño de las partículas antes del procesamiento térmico. Por lo que, una molienda de la sal y un posterior tamizado para obtener un material de menor tamaño podría ser una posible solución.



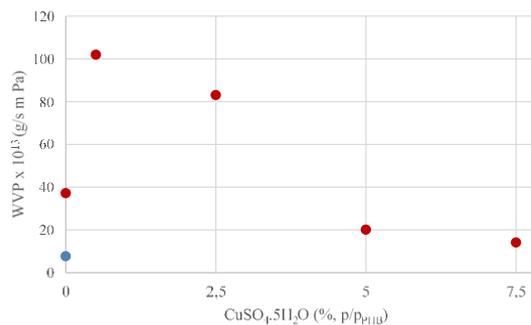
**Figura 3.** Propiedades mecánicas de películas de PHB con diferentes concentraciones de sulfato de cobre (II): (A) Deformación a la rotura ( $\epsilon_B$ ), (B) resistencia mecánica ( $\sigma_m$ ) y (C) módulo de Young ( $E$ ). Símbolos: (●) sin TBG, (●) con TBG.

La Figura 3C muestra que no hubo cambios importantes en los valores del módulo de Young con la adición de partículas de sulfato de cobre (II) hasta un 7,5 %. Tanto para las películas plastificadas con TBG como las que no tenían TBG, en el rango de concentraciones de sal de cobre estudiado, solo se observó una ligera disminución a elevadas concentraciones de sal. De acuerdo a Fu et al. (2008), la concentración de las partículas tiene baja influencia sobre la rigidez del material, como así también sobre la adhesión interfacial de los rellenos minerales/matriz polimérica, cuando se utilizan partículas de tamaño micrométrico de forma irregular como es el caso de los cristales de la sal de cobre empleados en este trabajo.

#### Permeabilidad al vapor de agua

Las propiedades de barrera de las películas de PHB dependen de la presencia de aditivos, de los compuestos empleados y de su concentración. En la Figura 4 se muestra el efecto del plastificante y de las diferentes concentraciones estudiadas de la sal de cobre sobre la permeabilidad al vapor de agua de las películas de PHB. Las películas sin plastificante (PHB-I-OCu) presentaron los valores más bajos de WVP, la incorporación de 20 % de este aditivo permitió incrementar notablemente esta propiedad de barrera

(PHB-I-OCu<sub>TBG</sub>). Esto podría atribuirse al incremento del volumen libre que favorecería la difusión de las moléculas de vapor de agua y a la miscibilidad del TBG en la matriz de PHB (Seoane et al., 2018). Por otra parte, según Requena et al. (2016) la presencia de regiones plastificadas más polares facilita la solubilidad del permeante, incrementando la WVP. La adición de la menor concentración de sulfato de cobre (II) ensayada (0,5 %) incrementó la WVP lo que podría deberse a que esta sal se encuentra hidratada, favoreciendo el aumento de esta propiedad de barrera. Sin embargo, la incorporación de las concentraciones más elevadas de la sal de cobre (2,5 - 7,5 %) redujo notablemente la WVP, debido seguramente al incremento de la tortuosidad inducido por la presencia de dominios (fase cristalina) impermeables dentro de la matriz (Follain et al., 2013). Además, Requena et al. (2016) mencionan que la disminución de la WVP podría atribuirse a la reorganización de los componentes de la matriz, como una cristalización secundaria o una posible separación de fases.

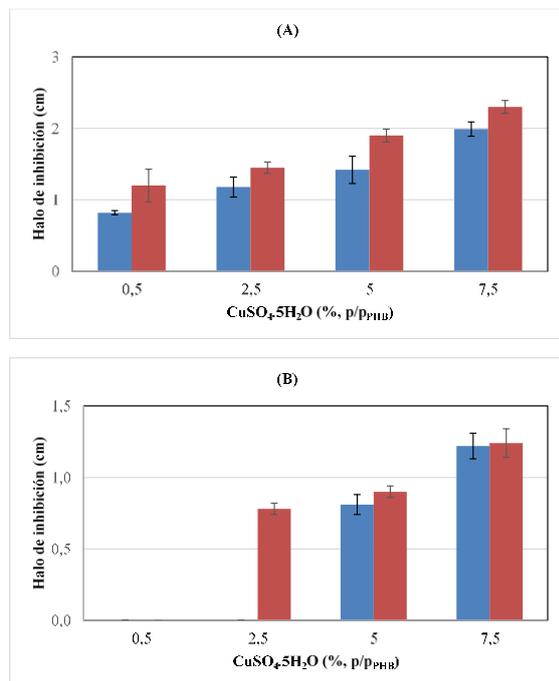


**Figura 4.** Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de PHB con diferentes concentraciones de sulfato de cobre (II). Símbolos: (●) sin TBG, (●) con TBG.

#### Capacidad antibacteriana

En la Figura 5 se muestra el halo de inhibición de las películas de PHB para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. La capacidad de las películas para inhibir el desarrollo microbiano está asociada con la difusión y liberación de la sustancia activa desde la matriz al medio. Por lo tanto, las cadenas de polímero deben moverse cooperativamente y así permitir el transporte del agente antimicrobiano. Todas las muestras que contenían sulfato de cobre (II) tuvieron capacidad para inhibir el desarrollo de *S. aureus* (Figura 5A), independientemente de la presencia del plastificante. Como era de esperar, cuanto mayor sea la concentración del agente antimicrobiano mayor será el halo de inhibición. En las películas de PHB plastificadas, el halo de inhibición bacteriana frente a *S. aureus* fue superior al correspondiente a las no plastificadas, comparando muestras con la misma concentración de sulfato de cobre (II). Esto se puede atribuir a que la reducción de las fuerzas intermoleculares por parte del plastificante, que mejora la movilidad de las cadenas poliméricas, disminuye el grado de cristalización y aumenta el coeficiente de difusión (Ishizawa y Nakamatsu, 2002; Quispe et al., 2021). En cuanto al efecto de las películas de PHB cargadas con sulfato de cobre (II) sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*, la concentración mínima de sal que inhibe el desarrollo bacteriano fue de 5 % para las películas no plastificadas (Figura 5B). En el caso de las películas de PHB plastificadas, esta concentración mínima fue de 2,5 %, remarcando nuevamente el efecto del plastificante sobre la difusión del agente antimicrobiano. Existe una clara diferencia en el efecto del sulfato de cobre (II) sobre la inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Cuando comparamos los diámetros de los halos de inhibición bacteriana para ambos tipos de bacterias a la misma

concentración de sal, el halo de *S. aureus* (Gram +, Figura 5A) fue mayor que el correspondiente a *P. aeruginosa* (Gram -, Figura 5B).



**Figura 5.** Halo de inhibición bacteriana de películas de PHB con diferentes concentraciones de sulfato de cobre (II) pentahidratado frente a: (A) *S. aureus* (gram +) y (B) *P. aeruginosa* (gram -). Símbolos: (■) sin TBG, (■) con TBG.

Las diferencias están asociadas principalmente a la estructura de la pared celular de ambas bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano y no tienen una membrana lipídica externa. Por otro lado, las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglicano, intercalada entre una membrana lipídica externa y la membrana plasmática, lo que da como resultado una estructura de bicapa lipídica. Esta estructura actúa como un tamiz molecular que permite la difusión de moléculas relativamente pequeñas, generando cierta protección contra varios agentes antibacterianos (Tafur et al., 2008).

#### 4. Conclusiones

Se demostró que es factible obtener películas de PHB con capacidad antibacteriana a partir de la incorporación de sulfato de cobre (II). Si bien los materiales fueron capaces de inhibir el desarrollo de bacterias Gram positivas como el *S. aureus* y de

bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*, se evidenciaron mejores resultados para el control de desarrollo de bacterias Gram positivas debido a diferencias en la pared celular de ambos tipos microorganismos. A pesar de que la incorporación de la sal de cobre permite otorgar capacidad antibacteriana a las películas de PHB, se obtuvo una disminución en la ductilidad y resistencia de las mismas debido al tamaño micrométrico de los cristales empleados. Para minimizar este efecto, sería conveniente reducir el tamaño de las partículas antes de incorporarlas a la matriz polimérica. Por otro lado, la presencia del agente antibacteriano incrementó la WVP cuando se agregaron bajas concentraciones, pero al incorporar concentraciones más elevadas, los valores de WVP disminuyeron por el incremento de la tortuosidad del pasaje de las moléculas de vapor de agua a través de la matriz. Las películas de PHB con propiedades antibacterianas podrían aplicarse en diversos campos como envasado de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos como así también para dispositivos biomédicos.

#### 5. Agradecimientos

Agradecemos a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Sur (UNS) por su apoyo financiero.

#### 6. Aclaración

Se deja constancia que parte de los resultados publicados en este trabajo han sido publicados previamente en el artículo "Films of Poly(Hydroxybutyrate) (PHB) and Copper with Antibacterial Activity" *Polymers* 2023, 15(13), 2907.

#### 7. Referencias

- Arancibia, M. y otros tres autores, (2014). Control antifúngico en plátano (*Musa acuminata*) mediante películas activas, Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 9, 141-145.
- Castañeta, G. y otros tres autores, (2020). Microplásticos: un contaminante que crece en todas las esferas ambientales, sus características y posibles riesgos para la salud pública por exposición. *Revista Boliviana de Química* 37(3), 142-157.

- Chan, R. y otros cinco autores, (2011). Manipulation of Polyhydroxybutyrate Properties through Blending with Ethyl-Cellulose for a Composite Biomaterial. *International Journal of Polymer Science* 651549, 1-8.
- Follain, N y otros cinco autores, (2013). Water transport properties of bio-nanocomposites reinforced by *Luffa cylindrica* cellulose nanocrystals. *Journal of Membrane Science* 427, 218-229.
- Fu, S.Y y otros tres autores, (2008). Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion, and particle loading on mechanical properties of particulate-polymer composites. *Composites Part B: Engineering* 39(6), 933-961.
- Grass, G. y otros dos autores, (2011). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1541-1547.
- Ishizawa, C.; Nakamatsu, J. (2002). Matrices Poliméricas para Liberación Controlada de Sustancias Activas. *Revista de Química* 16(1-2), 13-23.
- Miteluț, A.C. y otros cuatro autores, (2019). Soil ecotoxicity assessment after biodegradation of some polymeric materials. *Scientific Papers. Series A. Agronomy* 61, 538-543.
- Mittal, V. (2009). Polymer Layered Silicate Nanocomposites: A Review. *Materials* 2(3), 992-1057.
- Montes, M.L.I. y otros tres autores, (2016). Mezclas poli(3-hidroxibutirato)/ácido poliláctico: efecto del agregado de un plastificante natural. *Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales 16 SAM CONAMET*.
- Prado, J.V. y otros dos autores, (2012). Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Revista Médica Chilena* 140, 1325-1332.
- Quispe, M.M. y otros cuatro autores, (2021). Glycerol-based additives of poly(3-hydroxybutyrate) films. *Polymer Testing* 93, 107005.
- Ren, J. y otros tres autores, (2009). Preparation, characterization and properties of binary and ternary blends with thermoplastic starch, poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Carbohydrate Polymers* 77(3), 576-582.
- Requena, R. y otros tres autores, (2016). Effect of plasticizers on thermal and physical properties of compression-moulded poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxy-valerate)] films. *Polymer Testing* 56, 45-53.
- Seoane, I.T. y otros dos autores, (2018). Effect of two different plasticizers on the properties of poly(3-hydroxybutyrate) binary and ternary blends. *Journal of Applied Polymer Science* 135(12), 1-12.
- Tafur, J.D. y otros dos autores, (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infections* 12, 227-232.
- Toloue, E.B. y otros tres autores, (2019). Potential of an electrospun composite scaffold of poly(3-hydroxybutyrate)-chitosan/alumina nanowires in bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* 99, 1075-1091.
- Vincent, M. y otros tres autores, (2018). Contact killing and antimicrobial properties of copper. *Journal of Applied Microbiology* 124(5), 1032-1046.