

PELÍCULAS BIODEGRADABLES CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS EN BASE A ALMIDÓN Y NANOPARTÍCULAS DE ZnO

Patricia Castaño^{1}, Saddys Rodríguez Llamazares², Pedro Aqueveque³, Álvaro Maldonado⁴,
Silvia Riquelme⁵, Robinson G Padilla⁶, Johana Sanzana⁷*

1: Ingeniero de Materiales, Unidad de Desarrollo Tecnológico, Coronel, Chile

2: PhD. Química, Centro de Investigación de Polímeros Avanzados, Concepción, Chile

3: PhD. Ciencia Biológicas, Universidad de Concepción, Chillán, Chile

4: Ingeniero Civil Químico, Unidad de Desarrollo Tecnológico, Coronel, Chile

5: Ingeniero Civil de Materiales, Unidad de Desarrollo Tecnológico, Coronel, Chile

6: Ingeniero Agroindustrial, Universidad de Concepción, Chillán, Chile

7: Químico Analista, UDT, Coronel, Chile

*Contacto: p.castano@udt.cl

RESUMEN

Películas en base a almidón de papa Karu con diferentes concentraciones de nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) se prepararon mediante el método de solución-casting asistida por calentamiento por microondas. Las películas se caracterizaron química, térmica y mecánicamente. El contenido de NPs afectó las propiedades mecánicas y la respuesta anti-fúngica de las películas elaboradas. No se observó efecto de las NPs ZnO en las propiedades térmicas ni microestructurales.

Palabras Clave: *Nanopartículas de ZnO, Almidón de papa Karu, B.cinerea, Respuesta antifúngica*

ABSTRACT

Potato starch based films with different amounts of ZnO nanoparticles (NPs ZnO) were obtained from a solution-casting method with microwave heating. The films were characterized chemically, thermally and mechanically. The NPs ZnO content affected the mechanical and anti-fungal response of the films made. The thermal or microstructure properties of the films were not affected by NPs ZnO content.

Keywords: *ZnO nanoparticles, Karu potato starch, B.cinerea, Anti-fungal response*

1 INTRODUCCIÓN

Actualmente, el estudio de nanocompuestos con características biodegradables y propiedades funcionales es de amplio interés y encuentra aplicación en diversas áreas, entre las cuales cabe destacar la industria del envase y embalaje de alimentos [1]. Entre los polímeros provenientes de fuentes botánicas el almidón es el más promisorio por ser de fácil disponibilidad y bajo costo. En la literatura se encuentran numerosas investigaciones de compuestos en base a almidón reforzados con nanoestructuras tales como nano-arcillas, nanotubos de carbono, etc. [2], para mejorar las propiedades mecánicas, eléctricas y/o térmicas del almidón termoplástico. De otro

lado, el óxido de zinc (ZnO) se caracteriza porque actúa como agente anti-microbiano [3]. Estudios indican que nanopartículas de este compuesto inorgánico inhibe el crecimiento de varias especies de hongos como es el caso de la especie *Botrytis cinerea* [4] que es la causante de grandes pérdidas de frutos de exportación originarios de Chile, como son el arándano y la fresa. Sumado a lo anterior, el ZnO no es tóxico para el hombre [5], por ende, su aplicación en la industria del envase de alimentos es también promisoría. En este trabajo se realizaron películas en base a almidón extraído de papa Karu, originaria de Chile y aditivadas con nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) en cinco concentraciones diferentes, por medio del método “solución-casting” y asistido por calentamiento por microondas. Las propiedades químicas, térmicas, mecánicas, microestructurales y anti-fúngicas de las películas obtenidas se caracterizaron. Como resultado, las películas fueron homogéneas, no se afectaron térmicamente ni microestructuralmente por el método de preparación, ni por el contenido de nanopartículas en éstas. Según el contenido de NPs de ZnO las propiedades mecánicas fueron afectadas al igual que la respuesta anti-fúngica frente a la *B. cinerea*.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

El almidón fue extraído de la papa, variedad Karu, según lo descrito por Singh y Singh [6] con modificaciones. La papa fue facilitada por el Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA) de Osorno, Región de los Lagos, Chile. La glicerina (EMSURE[®], MercK) se utilizó como plastificante. Nanopartículas de ZnO al 40% p/p dispersas en etanol y con tamaño de partícula < 130 nm fueron adquiridas en Sigma Aldrich.

2.2 Preparación de las películas de almidón con NPs de ZnO

Se mezclaron 2.1 g de almidón y 0.9 g de glicerina en 60 ml de agua destilada. La dispersión se calentó en un horno de microondas a 40 MW (Thomas, modelo TH-20DM) de potencia por 3 min y 30 s. Durante este tiempo, cada 15 s la mezcla se sacó del microondas y se agitó por 10 s con una bagueta. Una vez gelatinizado el almidón, se adicionaron las NPs y el conjunto se agitó empleando una placa magnética y un baño de ultrasonido, cada uno en intervalos sucesivos de 8 min hasta completar 40 min. La mezcla se filtró al vacío y luego se dejó en baño de ultrasonido nuevamente por 8 min antes de ser vaciada sobre un molde de acrílico de 10 x 10 cm. Finalmente, se secó en estufa a 30°C.

2.3 Caracterización

2.3.1. Caracterización de los gránulos de almidón

El contenido de amilosa aparente se determinó por el método colorimétrico (UNE- EN ISO 6647-1). La absorbancia se midió a 600 nm. El método gravimétrico se utilizó para determinar el contenido de humedad y de cenizas del almidón. El contenido de nitrógeno se evaluó utilizando la técnica Kjendhal (AOAC, 1990). La composición de los elementos inorgánicos se determinó semicuantitativamente mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X (S4 PIONNER, Bruker AXS, Alemania). La morfología y el tamaño de partículas se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) (JEOL-JSM 6380 LV, Japón). La distribución del tamaño del gránulo se determinó por la técnica de granulometría láser (Beckman Coulter LS 200, Brea CA, USA). La estabilidad térmica se evaluó mediante análisis termogravimétrico (TGA) (NETZSCH

209 F3, Tarsus, Alemania). El espectro de difracción de rayos X se midió en un difractómetro Bruker Endeavour (D4/max-B, Alemania) con radiación Cu K α (40 KV and 20 mA), en el rango de 2θ de 2-35° a 0.02° de paso y 3s de tiempo de conteo.

2.3.2. Caracterización de las películas de almidón con NPs de ZnO

El contenido de Zn en las películas se determinó por plasma de acoplamiento inductivo/espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES, Perkin Elmer, modelo Optima 7000 DV) según normas UNE-EN 15290 y UNE-EN 15297. El análisis térmico se realizó por medio de TGA en atmósfera inerte. La superficie fracturada criogénicamente de las películas se analizó por SEM. Los ensayos de tracción se realizaron siguiendo la norma ASTM D 1238 (Karg Industrietechnik machine, Krailling, Germany). El análisis estructural se realizó a partir de los difractogramas de rayos X, en el rango de barrido 2θ de 4-80° a 0.02° de paso y 1s de tiempo de conteo.

2.3.3. Determinación de la actividad anti-fúngica de las películas aditivadas con NPs de ZnO

La respuesta anti-fúngica, frente al hongo de la especie *B. cinerea*, se evaluó mediante la técnica de difusión en agar con algunas modificaciones [7]. Previamente se determinó el halo de inhibición en las películas sin nanopartículas y con éstas en cantidades mínima y máxima, utilizando una concentración de 10^4 - 10^5 conidias /ml de esporas del hongo. Las esporas se depositaron directamente sobre el medio PDA (potato dextrosa agar, Merck) y sobre éstas se pusieron las películas. En las películas con cantidades intermedias de NPs se evaluó la inhibición al crecimiento micelial, depositando 1 μ l de suspensión de esporas en el centro de cada una de ellas. Como control se depositaron 6 gotas de 1 μ l de suspensión de esporas sobre el medio de cultivo, en puntos equidistantes de la placa Petri. En todos los casos, las placas Petri se sellaron y se mantuvieron a 25°C durante 7 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se resume la composición química del almidón de papa de la variedad Karu. El contenido de amilosa del almidón de papa fue superior a lo reportado en la literatura para este tipo de almidón, que oscila entre 15 a 30% [8]. La sobrestimación del contenido de amilosa en los almidones de papa está relacionada con que el yodo y las cadenas largas ramificadas exteriores de la amilopectina también pueden formar un complejo de inclusión de color azul [9].

Tabla 1. Composición química del almidón de papa Karu.

Composición	valor
Contenido de humedad (%)	9.4
Contenido de ceniza (g/100g almidón seco)	0.203
Contenido de nitrógeno (%)	0.573
Contenido de fósforo (%)	0.215
Contenido de calcio (%)	0.120
Contenido de amilosa aparente (%)	33.03

Los gránulos de almidón de papa mostraron tres tipos de morfología: esférica para los gránulos pequeños, ovalada para los gránulos con tamaños entre 30 - 70 μm e irregular para los gránulos con tamaños superiores a 70 μm . La descomposición térmica del almidón de papa ocurrió en dos etapas. En la primera etapa ocurre la evaporación de agua o deshidratación de los gránulos de almidón. Este proceso comenzó a temperatura ambiente y finalizó a los 105°C. La pérdida de peso en esta etapa fue de 10%. Este resultado concuerda con el contenido de humedad obtenido por el análisis gravimétrico. La segunda etapa comenzó a los 302°C y está asociada con la descomposición de la materia orgánica o degradación térmica del almidón. A los 600 °C queda un remanente de masa de 10% aproximadamente, la cual está constituida por compuestos orgánicos asociados al calcio y al fósforo, identificados por espectrofotometría de rayos X (ver Tabla 1). El almidón de papa presentó un patrón de difracción típico de la estructura tipo B, con picos característicos 2θ igual a 6°, 17° y 22° [10].

3.2 Caracterización de las películas de almidón con NPs de ZnO

El contenido de Zn en cada película y el porcentaje equivalente de NPs de ZnO calculado, se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido de Zn y ZnO en las películas.

Película	mg Zn/Kg muestra	% p/p ZnO
AK 1	1677 \pm 97	0.21 \pm 0.01
AK 2	7642 \pm 46	0.95 \pm 0.01
AK 3	10577 \pm 196	1.32 \pm 0.02
AK 4	30126 \pm 176	3.75 \pm 0.02
AK 5	46028 \pm 80	5.73 \pm 0.01

Los diagramas TGA de todas las películas (ver Fig. 1), indicaron que la pérdida de masa en función de la temperatura ocurrió en las mismas dos etapas que para el caso de los gránulos de almidón [11].

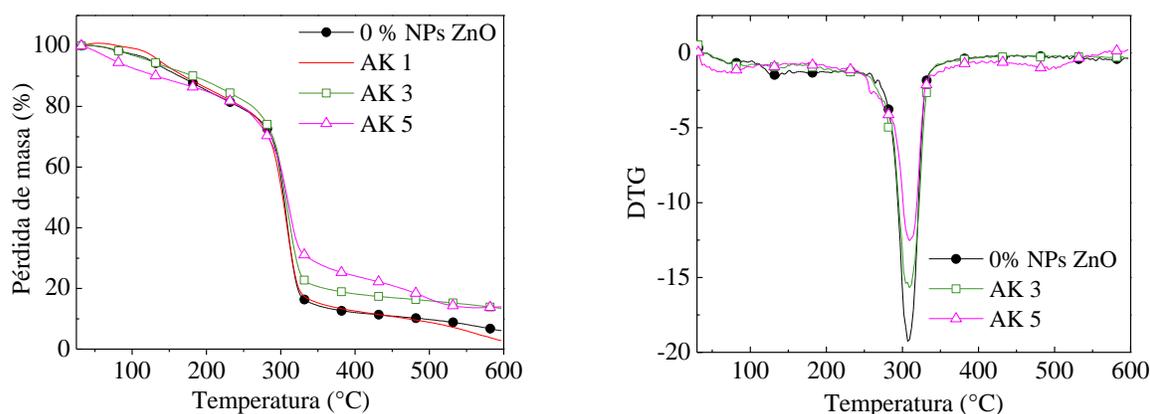


Figura 1. Termogramas de las películas de almidón con NPs de ZnO.

El porcentaje de masa residual a los 600°C dependió del contenido de NPs de ZnO, así a mayor contenido de éstas mayor masa residual. La superficie de fractura de las películas indicó que la distribución de las NPs dependió del contenido de éstas. Así, las películas con contenidos entre el

0.21% al 3.75% de NPs, presentaron una buena distribución de éstas. Por el contrario, para la película con el 5.73% de NPs de ZnO se observaron zonas blancas indicadas con un círculo en la micrografía, correspondientes a aglomerados de las NPs (ver Fig. 2).

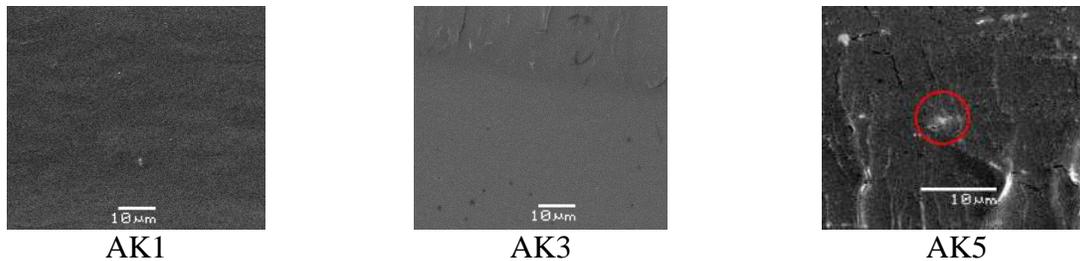


Figura 2. Micrografías SEM, para diferentes películas de almidón aditivados con NPs de ZnO.

Las curvas obtenidas de los ensayos de tracción mostraron una zona lineal correspondiente al comportamiento elástico de la película y un incremento del porcentaje de alargamiento con el incremento asintótico de la tensión aplicada. La influencia del contenido de NPs de ZnO se observó claramente sólo para las películas con el mínimo y máximo contenido de NPs. En éste el porcentaje de alargamiento a la ruptura disminuyó con el mayor contenido de NPs de ZnO, mientras que la tensión máxima aumentó, los valores y la tendencia se indican en la figura 3.

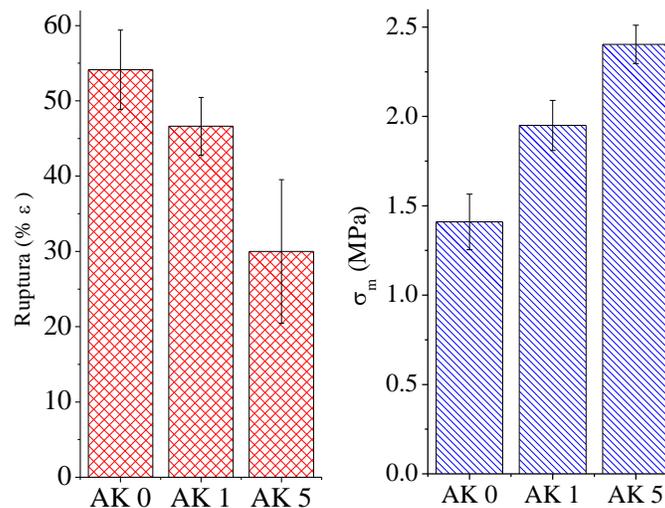


Figura 3. Valores obtenidos de los ensayos de tracción. AK 0 (0% ZnO)

En los difractogramas de DRX de todas las películas se identificaron los picos característicos del ZnO, a 2 theta igual a 31°, 34° y 36.5°. La naturaleza cristalina hexagonal tipo wurtzita de las NPs no fue afectada aparentemente por el almidón, ni por el método de preparación de la película. No se observó un corrimiento significativo en los picos de difracción. Los picos característicos del almidón 2 theta igual a 6°, 17° y 22° también se observaron en todas las películas a excepción de aquella con el contenido máximo de NPs de ZnO por el apantallamiento de la estructura cristalina sobre la amorfa.

Los ensayos de evaluación anti-fúngica preliminares indicaron que al cabo de 7 días la película con la concentración máxima de NPs de ZnO formó un halo de inhibición y no se contaminó y la

película con la concentración mínima también formó un halo de inhibición pero se contaminó moderadamente. En cambio la película sin NPs se contaminó completamente sin formar halo de inhibición. En el segundo tipo de ensayo, se observó que las películas con la concentración mínima y del 0.95% de NPs no inhibieron el crecimiento micelial del hongo, la película con el 1.32% inhibió moderadamente, mientras que la película con el 3.75% inhibió completamente el crecimiento de la *B. cinerea*. En la Figura 4 se muestra el registro fotográfico del comportamiento anti-fúngico de las películas de almidón frente a la *B. cinerea*, al cabo de 7 días y a 25°C. En la Fig. 4A, se señaló con una flecha los halos de inhibición y en círculo las zonas contaminadas de la película. En la Fig. 4B se observan las películas que inhibieron o no el crecimiento micelial de esporas del hongo depositadas directamente sobre ellas.

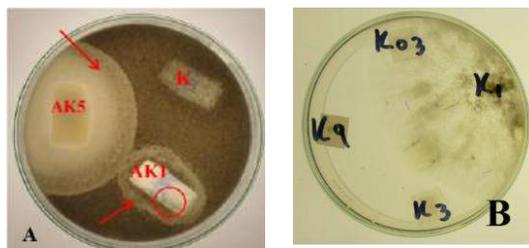


Figura 4. A). Película: K (0% NPs ZnO). B) Películas: K03 (AK1), K1 (AK2), K3 (AK3), K9 (AK4).

4 CONCLUSIONES

Las películas aditivadas con NPs de ZnO mostraron una distribución homogénea de las fases presentes, a excepción de la película con el mayor contenido de NPs (5.73% p/p). Las propiedades térmicas y microestructurales del almidón no se afectaron por las NPs de ZnO, ni por el método de calentamiento empleado en la preparación de las películas. Las concentraciones mínima y óptima de NPs de ZnO en el almidón de papa Karu, para inhibir la proliferación de la especie de hongo *B. cinerea* debe ser mayor a el 1.32%. No es conveniente concentraciones de NPs de ZnO superiores al 5.73% por el evidente aglomerado de ellas en las películas.

5 AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONICYT por el financiamiento del proyecto FONDEF IDEA CA 12i10307, a partir del cual se desarrolló este trabajo. Los autores también agradecen a CONICYT REGIONAL/GORE BÍO BÍO/CIPA/R08C1002.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siracusa, V. Rocculi, P. Romani, S Rosa, M.D, “Biodegradable Polymer for food packaging: a review”, Food Science and Technology, No. 19, 634-643, 2008.
2. Cao, X. D., Chen, Y., & Chan, P. R, “Preparation and properties of plasticized starch/multiwalled carbon nanotubes composites”, Journal of Applied Polymer Science, 106, 1431-1437, 2007.

3. Pérez Espitia, P.J. Ferreira, N. Teófilo, R, et al. “Physical–mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 94, 199–208, 2013
4. Lili, He., Yang, Liu., Azlin, Mustapha., Mengshi, Lin., “Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*”, *Microbiological Research*, 166, 207-215, 2011.
5. FDA. “Part 182, Substances generally recognized as safe”, 2011. Recuperado el 20 de Abril del 2013 de <http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&sid=786bafc6f6343634fbf79fcdca7061e1&rgn=div5&view=text&node=21:3.0.1.1.13&idno=21#21:3.0.1.1.13.9>
6. Singh, J., Singh N., “Studies on the morphological, thermal and rheological properties of starch separated from some Indian potato cultivars”, *Food Chemistry*, Vol. 75, No. 1, 67-77, 2001.
7. Anke, H., Bergendorff, O., & Sterner, O. “Assays of the Biological Activities of Guaiane sesquiterpenoids Isolated”, *Food Chemical Toxicology*, 393-397, 1989.
8. Hoover, R., “Composition, molecular structure, properties and modification of pulse starches: A review”, *Food research international*, 43., 339-413, 2010.
9. Srichuwong, S., “Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility”, *Carbohydrate polymers*, 60., 529-538, 2005.
10. Jiping, P., “Comparative studies on morphological and crystalline properties of B-type and C-type starches by acid hydrolysis”, *Food Chemistry*, 105., 989-995, 2007.
11. Castaño, J., Bouza, R., Rodríguez-Llamazares, S., Carrasco, C., Vinicius, R.V.B., “Processing and characterization of starch-based materials from pehuén sedes”, *Carbohydrate Polymers*, 88, 291-299, 2012.