

Envases activos nanocompuestos para la conservación de un producto lácteo

Ortega F. (1), Arce V.B. (2), García M.A. (1)

(1) CIDCA, Facultad Ciencias Exactas UNLP – CONICET La Plata - CICPBA, 47 y 116 S/Nº, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina.

(2) CIOP (CICPBA -CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.

Dirección de e-mail: florortega.28@gmail.com

RESUMEN

Con el fin de desarrollar películas nanocompuestas con capacidad antimicrobiana, se acopló la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) a la preparación de suspensiones filmogénicas de almidón de maíz obteniéndose los correspondientes films mediante la técnica de casting. Las AgNPs fueron sintetizadas mediante un método químico "verde" y se caracterizaron por técnicas espectrofotométricas y microscopía electrónica, encontrando que son esféricas con un diámetro que varía entre los 5 y 20 nm. La adición de nanopartículas no afectó la capacidad filmogénica de la suspensión de almidón gelatinizado. El contenido de AgNPs causó un leve aumento en la opacidad manteniendo la capacidad de barrera al UV del material. Se observó que la permeabilidad al vapor de agua disminuyó con la concentración de AgNPs incluidas en la formulación. Además, las AgNPs permiten el refuerzo de la matriz, desarrollando un material más resistente y tenaz, con superficies lisas y homogéneas como se evidencia por SEM. Las películas nanocompuestas con concentraciones de AgNPs mayores a 25µM inhibieron el crecimiento de *E. coli ATCC* y *Salmonella spp.*, responsables de la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos. Películas conteniendo 50 µM de AgNPs permitieron extender la vida útil de queso fresco durante 21 días.

Palabras Clave: Nanopartículas, Películas activas, Capacidad antimicrobiana.

ABSTRACT

In order to develop nanocomposite films with antimicrobial capacity, synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was coupled to filmogenic corn starch suspensions preparation, obtaining the corresponding materials by casting technique. The AgNPs were synthesized by a chemical "green" method, were characterized by spectrophotometric techniques and electron microscopy, finding that they are spherical with diameters varying between 5 and 20nm. The addition of nanoparticles did not affect the filmogenic capacity of gelatinized starch suspension. The content of AgNPs caused a slight increase in film opacity, keeping the material UV-barrier capacity. A decrease in water vapor permeability with increasing AgNPs concentration was observed. Besides, AgNPs allows the matrix reinforcement, developing a more resistant and tough material, with smooth and homogeneous surfaces as evidenced by SEM. Nanocomposite films containing AgNPs concentrations greater than 25 µM inhibited the growth of *E. coli ATCC* and *Salmonella spp.*, which are responsible for most foodborne diseases. Films containing 50 µM AgNPs allowed to extend the shelf-life of fresh cheese samples for 21 days.

Keywords: Nanoparticles, Active films, Antimicrobial capacity.



INTRODUCCIÓN

Los envases alimentarios cumplen funciones muy importantes para la conservación de alimentos, previniéndolos de contaminaciones físicas, químicas y/o microbiológicas, así como también de su posible adulteración. La aplicación de la nanotecnología permite el desarrollo de nanobiocompuestos, que consisten en una matriz biopolimérica reforzada con algún material en la escala nanométrica (1-100nm), lo cual permite mejorar sus propiedades mecánicas, térmicas, ópticas y fisicoquímicas (Rhim et al. 2013, Kuorwel et al. 2015). En este contexto, desde hace unos años se han incorporado tanto a películas biodegradables como sintéticas, nanopartículas metálicas de oro, plata, cobre, o sus óxidos, entre otros. Sin embargo, las nanopartículas de plata son comúnmente utilizadas debido a su estabilidad óptica, catalítica, térmica y eléctrica, además de ofrecer actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias, virus y hongos (Zhang et al. 2008, Rhim et al. 2013).

La síntesis química es el procedimiento más utilizado para la obtención de AgNPs de forma y tamaño controlado, a partir de la reducción de una sal de plata usando un agente reductor químico en presencia de un estabilizante (Masala y Seshadri 2004). En la actualidad se observa un incremento en el desarrollo de síntesis verdes amigables con el medio ambiente y la salud, basadas en la utilización de solventes no tóxicos, y agentes reductores y estabilizantes de bajo impacto ambiental (Raveendran et al. 2003). Oluwafemi et al. (2013) reportaron una síntesis controlada utilizando maltosa como agente reductor en presencia de almidón como estabilizante, obteniendo nanopartículas de plata con diámetros ≤ 5 nm. Otros autores han observado que AgNPs obtenidas por métodos de síntesis química verde han demostrado tener buena actividad antimicrobiana inclusive a concentraciones de orden mM (Cheng et al. 2015, Cheviron et al. 2014).

Los objetivos propuestos para este trabajo fueron acoplar la síntesis de AgNPs a las suspensiones filmogénicas, caracterizar tanto las nanopartículas como las películas nanocompuestas desarrolladas y finalmente evaluar su capacidad antimicrobiana y aplicación como envase activo para la conservación de un producto lácteo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de las películas nanocompuestas previamente se gelatinizó una suspensión de almidón de maíz al 3%p/p a 78°C durante 20min. El acoplamiento de la síntesis de AgNPs a la suspensión filmogénica se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Oluwafemi et al. (2013) con algunas modificaciones. A las suspensiones gelatinizadas se le agregaron 10 ml de solución de AgNO_3 (5-50 μM) y luego 20 ml de maltosa 1.310^{-3} M como agente reductor. Para lograr la formación de las AgNPs los sistemas se mantuvieron en agitación a 78°C durante 20 min. Transcurrido este tiempo, las suspensiones se enfriaron hasta 50°C y se les agregó glicerol como plastificante (30%p/p en relación al almidón), (López et al. 2013). Las películas se obtuvieron por moldeo y deshidratación de las suspensiones filmogénicas a 50°C (método de casting). Se prepararon además películas control sin el agregado de AgNPs.

Con el fin de corroborar la formación de AgNPs, se obtuvo el espectro UV-vis entre 200-800 nm utilizando un espectrómetro T90+UV/vis Spectrometer (PG Instruments, USA). Luego para la caracterización de su tamaño y forma se realizó una microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio JEM 1200EX II, (Jeol, Japón), operando a 80kV, y equipado con una cámara Erlangshen ES1000W, Model 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA), completando la observación con imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) realizadas con un FE-SEM ZeissSupra™ 40 (Alemania) con cañón de electrones por emisión de campo, una columna GEMINI® de tercera generación y un detector In-Lens. El voltaje de aceleración utilizado fue de 3,00 kV.

En relación a la caracterización de las películas nanocompuestas se evaluó el color superficial con un colorímetro Minolta (CR 300, Japón), midiéndose los parámetros de luminosidad (L^*), y cromaticidad a^* y b^* , los cuales se utilizaron para determinar la diferencia de color (ΔE) respecto al control. La opacidad y capacidad de barrera al UV se obtuvieron a partir de la integración de los espectros de absorbancia del espectro UV-vis obtenidos con un espectrofotómetro, T90+UV/vis Spectrometer (PG Instruments, USA) en la región de 400 a 700nm y 200 a 400nm respectivamente. La transparencia se calculó según lo propuesto por Zhang y Hang (2006). Se determinó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) siguiendo el método ASTM E96 con algunas modificaciones (López et al. 2011). La solubilidad del material desarrollado en agua, a 25 y 100°C, se obtuvo mediante un ensayo de diferencia de masas luego de que porciones regulares de las películas (4cm^2), estuvieran sumergidas durante 1h en el solvente. El correspondiente comportamiento mecánico de las películas se estudió mediante ensayos de tracción con un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems



(Inglaterra), utilizando mordazas de tensión A/TG sobre probetas de 0.6x7cm. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas por el software del equipo, Texture Expert Exceed y a partir de éstas se obtuvieron los parámetros de esfuerzo ténsil (TS, MPa), módulo elástico (ME, MPa) y elongación a la ruptura (E, %).

La correspondiente capacidad antimicrobiana se evaluó a través de un ensayo de difusión en agar sobre cepas de *S. aureus* ATCC, *Salmonella spp.*, *E. Coli* ATCC y *Penicillium spp.* siguiendo el protocolo de Pranoto et al. (2005). Placas con agar Mueller-Hinton (Merck) se inocularon con 100 µl del inóculo correspondiente para el caso de las bacterias (10^4 UFC/ml), mientras que para el *Penicillium spp.* (10^2 UFC/ml) se inocularon placas con agar YGC (Merck). Se cortaron discos de los films de 2 cm de diámetro, se colocaron directamente sobre las placas de Petri y finalmente se incubaron a 37°C realizándose observaciones visuales durante 72 hs para el caso de las bacterias y 7 días para el hongo.

Para el ensayo de aplicación de las películas activas, se envasaron muestras de 10 g de queso fresco utilizando los films con una concentración de AgNPs 50 µM, los cuales se termosellaron. Siguiendo el procedimiento de López et al. (2013), las muestras fueron almacenadas a 4°C en bolsas sintéticas de PD 141(CRYOVAC®). Recuentos de hongos y levaduras se hicieron al tiempo inicial, y luego de 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a partir de la siembra de 100 µl de los homogenatos de las muestras de queso almacenadas, sobre placas con agar YGC las cuales se incubaron durante 5 días a 37°C. Los recuentos de microorganismos viables se determinaron por conteo del número de colonias formadas, expresándose los resultados como UFC/g queso.

Se realizó el análisis multifactorial de varianzas y, regresiones lineales y no lineales con el software Systat® (Versión 13.0). Las diferencias en las propiedades de las películas y las formulaciones se determinaron mediante el test de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) usando un nivel de significación $\alpha=0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro UV-vis confirmó la formación de AgNPs, ya que se evidenció por espectrofotometría la presencia del plasmón característico con máximo a 425nm. La amplitud de dicho plasmón se debe a la interacción de las nanopartículas con la matriz y a una posible aglomeración de las mismas. (**Figura 1a**). Mediante los estudios de TEM y SEM se observó que las nanopartículas presentan una morfología esférica con una distribución uniforme sobre la matriz, y en algunos casos se encuentran formando aglomerados. Mediante el software Image J se calculó el diámetro medio de las AgNPs sintetizadas, siendo el mismo de 21 ± 6.7 nm. (**Figura 1b y c**)

En relación al color de las películas obtenidas, las diferencias de color (ΔE), la luminosidad (L^*) y el parámetro de cromaticidad b fueron afectados por la presencia de AgNPs (**Figura 2**). Sin embargo, debido a la baja concentración de AgNPs utilizadas, visualmente las películas resultaron ser prácticamente incoloras. Con respecto a la capacidad de barrera al UV, todas las películas desarrolladas presentaron esta característica, sin embargo, se observó que a concentraciones mayores a 10 µM AgNPs su comportamiento era similar al de las películas control. El agregado de AgNPs y su concentración no afectó significativamente ($p>0,05$) la opacidad y transparencia de las películas desarrolladas, obteniéndose en general materiales con cierto grado de opacidad. El agregado de AgNPs disminuyó significativamente ($p<0.01$) la WVP de las películas, pero no se observaron efectos significativos a concentraciones mayores a 10 µM. Este comportamiento podría atribuirse a un aumento en la tortuosidad de la matriz de las películas desarrolladas. Observaciones al SEM (**Figura 3a**) de la superficie de las películas desarrolladas permitieron explicar los bajos valores obtenidos para dicho parámetro, ya que se evidenció la ausencia de grietas, poros o imperfecciones en la superficie. Asimismo, en las micrografías observadas no se detectó migración superficial del glicerol, lo cual refleja la compatibilidad de la matriz con el plastificante. Seguidamente, se confirmó la presencia de AgNPs en los films activos con la espectroscopía EDX. En la **Figura 3b** se puede ver que los principales elementos detectados fueron C y O, debido a la composición del almidón, y una fuerte señal del Au correspondiente a la metalización de la muestra; cerca de los 3keV se observa una señal característica debida a la resonancia de plasmones superficiales de las AgNPs (Bindhu y Umadevi 2013).

a)

b)



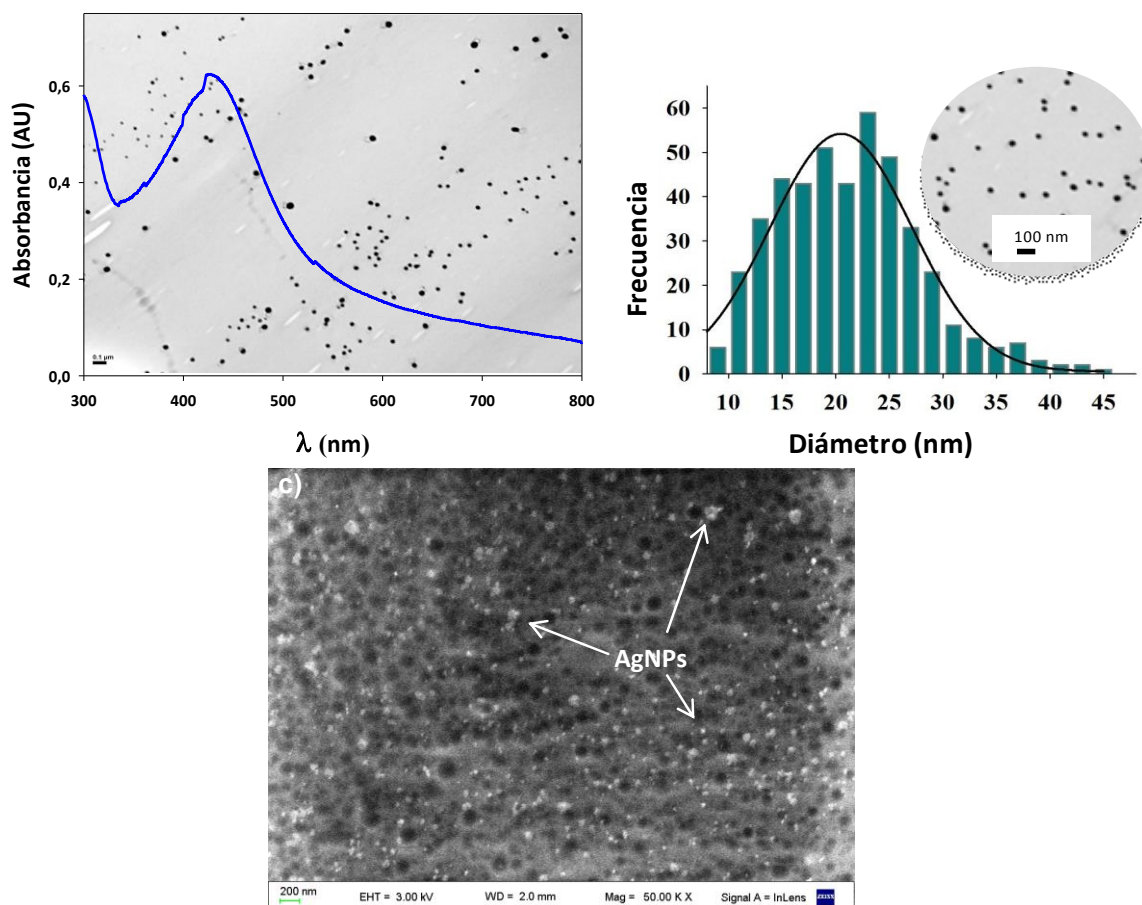


Figura 1. Nanopartículas de plata estabilizadas con almidón de maíz: a) observación del espectro UV-visible, b) correspondiente histograma, y c) micrografías de SEM de las correspondientes NPs (puntos blancos) distribuidas en la matriz polimérica.

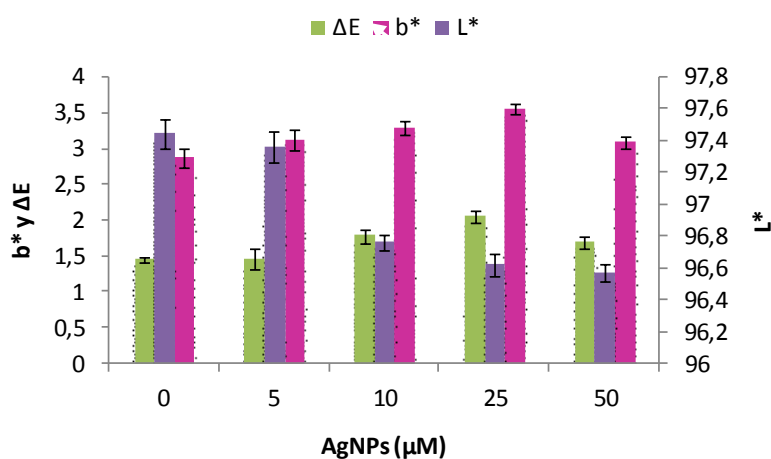


Figura 2. Parámetros de color superficial de las películas desarrolladas.



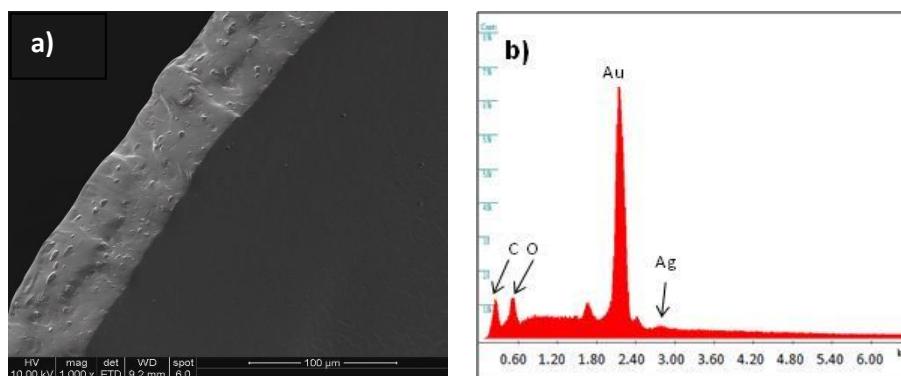


Figura 3. a) Micrografía electrónica de barrido de la sección transversal de la película de almidón de maíz con 50μM de AgNPs y b) espectro EDX.

Independientemente de la temperatura ensayada se observó que en general la solubilidad de las películas disminuye con el aumento del contenido de AgNPs, siendo este efecto significativo ($p < 0,05$) a 25°C y haciéndose muy significativo ($p < 0,01$) a 100°C. A temperatura ambiente (25°C), los films nanocompuestos fueron 31% solubles, mientras que a 100°C su solubilidad aumentó a 45%, debiéndose esta conducta a que las AgNPs permitirían el desarrollo de una estructura más resistente, indicando un posible efecto de refuerzo. Como se puede observar en la **Figura 4**, los resultados de solubilidad fueron consistentes con los obtenidos para WVP.

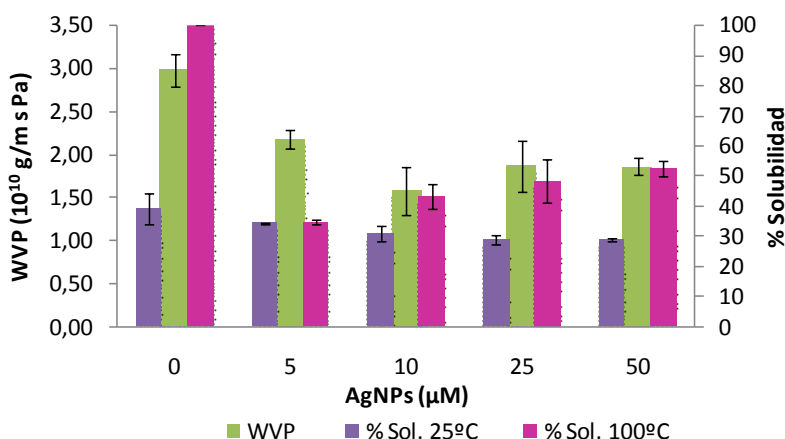


Figura 4. Parámetros de permeabilidad al vapor de agua y solubilidad de las películas nanocompuestas con respecto al control.

Las curvas de tensión-deformación (**Figura 5**) de las películas control mostraron que su comportamiento mecánico corresponde al de un material dúctil y flexible, mientras que las de las películas con 50 μM AgNPs se asocian a un material más fuerte, sugiriendo que las nanopartículas se comportan como un refuerzo inorgánico de la matriz polimérica. Las películas con concentraciones de AgNPs hasta 25 μM exhibieron significativamente ($p < 0,01$) mayor resistencia a la tracción que las películas control, evidenciando el refuerzo de la matriz. Sin embargo, la elongación a la ruptura se mantuvo prácticamente constante (alrededor del 40%), lo que lleva a materiales resistentes y duros. Considerando al módulo elástico como un indicador de la rigidez del material cuanto mayor es su valor, se observó un efecto significativo ($p < 0,05$) en dicho parámetro por el agregado de nanopartículas, lo cual permite sostener la idea del efecto de refuerzo de la matriz por las AgNPs.



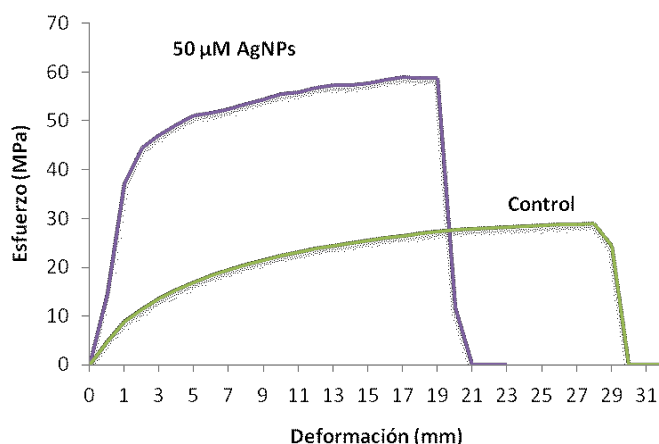


Figura 5. Perfil de esfuerzo-deformación de películas de almidón de maíz control y con el agregado de AgNPs en concentración 50µM.

Con respecto a la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas activas, los resultados revelaron que la inhibición fue por contacto dado que no se observó un halo de inhibición, sugiriendo que no habría migración de las AgNPs desde la matriz (**Tabla 2**). La inhibición del crecimiento de *E. Coli ATCC* fue apreciable a partir de la concentración de AgNPs de 25 µM, en cambio para *Salmonella spp.* el efecto se hizo efectivo a partir de 10 µM. Para *S. aureus ATCC* solo se observó una marcada disminución del desarrollo en las placas de 50 µM AgNPs, respecto al resto de las concentraciones. Estos resultados se pueden asociar con la diferente estructura de la membrana celular y con el grosor de la capa de peptidoglicano de la misma, siendo las bacterias Gram negativas (*E. Coli ATCC*, *Salmonella spp.*) más sensibles que las Gram positivas (*S. aureus ATCC*). Para *Penicillium spp.*, se observó una reducción del crecimiento con las películas que contenían una concentración de AgNPs de 10 µM y una inhibición completa para concentraciones ≥ 25 µM.

Tabla 1. Inhibición del desarrollo de *E. Coli ATCC*, *Salmonella spp.*, *S. aureus ATCC* y *Penicillium spp.* de películas nanocompuestas y control.

AgNPs en películas nanocompuestas (µM)	<i>E. Coli ATCC</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. aureus ATCC</i>	<i>Penicillium spp.</i>
0	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	-	+	-	< crecimiento
25	+	+	-	+
50	+	+	< crecimiento	+



En base a los resultados obtenidos seleccionamos las películas con concentración de AgNPs de $50\mu\text{M}$, ya que además de su capacidad antimicrobiana, presentaron mayor integridad al ataque de microorganismos, así como también mejores propiedades de barrera y mecánicas. Por termosellado de los nanocompuestos se obtuvieron envases, los que permitieron almacenar muestras de queso fresco a 4°C . La vida útil de las muestras de queso refrigeradas está determinada principalmente por la contaminación microbiana. El queso fresco se caracteriza por ser un producto poco fermentado, aunque ligeramente ácido ($\text{pH} \approx 5$), con actividad acuosa elevada, un bajo porcentaje de sal ($< 3\%$) y con un potencial de óxido-reducción electronegativo (ausencia de oxígeno). Estas condiciones permiten el desarrollo de muchos microorganismos, especialmente de hongos y levaduras. Así, se definió la vida útil del queso fresco como el tiempo necesario para alcanzar 10^6 UFC/g de muestra (López et al. 2011). Teniendo en cuenta este valor, para la muestra control la vida útil fue de 14 días, mientras que para la muestra envasada con la película nanocompuesta la vida útil media fue de 21 días (**Figura 6**).

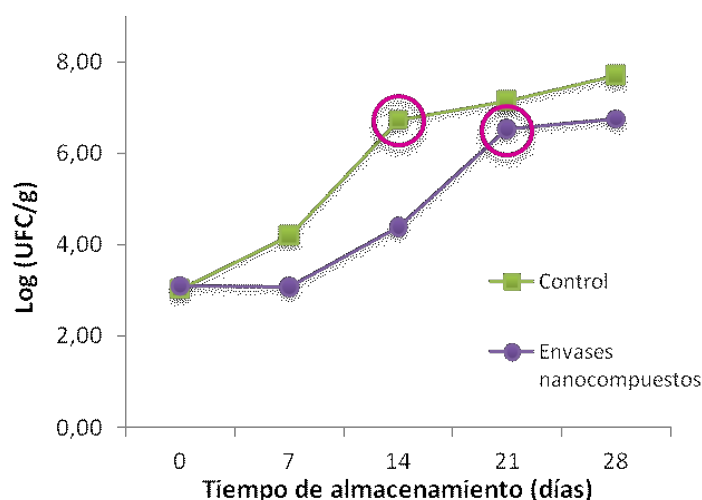


Figura 6. Efecto de los films nanocompuestos sobre la vida media de muestras de queso fresco almacenadas a 4°C .

CONCLUSIONES

Fue posible acoplar la síntesis de AgNPs directamente a la obtención de la matriz polimérica de almidón, mediante una metodología simple y de fácil implementación.

La caracterización de las AgNPs mediante técnicas espectrofotométricas y de microscopía electrónica, permitió estimar que su tamaño medio es de 21 nm y que en ciertos casos las mismas se encuentran formando aglomerados.

Por otro lado, la incorporación de AgNPs no afectó la capacidad filmogénica de la suspensión de almidón gelatinizada, siendo las películas obtenidas homogéneas e incoloras, manteniendo en todos los casos su capacidad de barrera al UV. Con respecto a las propiedades de barrera, se observó una disminución en la WVP, al aumentar la concentración de nanopartículas, lo cual es satisfactorio ya que evitaría la condensación de humedad dentro de los envases obtenidos con este material y el posible desarrollo de microorganismos. Además, las AgNPs permitieron reforzar la matriz polimérica, dando un material más resistente y tenaz.

En relación a la capacidad antimicrobiana, las películas nanocompuestas mostraron tener un gran efecto sobre patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos, tanto Gram positivos como negativos, a concentraciones mayores a $25\mu\text{M}$. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las películas de concentración $50\mu\text{M}$ de AgNPs para evaluar la vida útil de un producto lácteo. Estas películas activas fueron capaces de extender la vida útil de muestras de queso fresco durante 21 días.



BIBLIOGRAFÍA

- BindhuMR, UmadeviM. 2013. Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using Hibiscus cannabinus leaf extract and its antimicrobial activity, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 101: 184–190.
- ChengF, BettsJW, KellySM, HectorAL. 2015. Green synthesis of highly concentrated aqueous colloidal solutions of large starch-stabilised silver nanoplatelets, *Materials Science and Engineering C* 46: 530–537.
- Cheviron P, Gouanvé F, Espuche E. 2014. Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites, *Carbohydrate Polymers* 108: 291–298.
- KuorwelKK, CranMJ, OrbellJD, BuddhadasaS, BiggerSW.2015. Review of Mechanical Properties, Migration, and Potential Applications in Active Food Packaging Systems Containing Nanoclays and Nanosilver, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 411–430.
- López OV, Lecot CJ, Zaritzky NE, García MA. 2011. Biodegradable packages development from starch based heat sealable film, *Journal of Food Engineering* 105: 254–263.
- LópezOV, GiannuzziL, ZaritzkyNE, GarcíaMA.2013. Potassium sorbate controlled release from corn starch films, *Materials Science and Engineering C* 33: 1583–1591.
- Masala O and Seshadri R. 2004. Synthesis routes for large volumes of nanoparticles. *Annu. Rev. Mater. Res.* 34: 41–81.
- Oluwafemi OS, Vuyelwa N, Scriba M, Songca SP.2013. Green controlled synthesis of monodispersed, stable and smaller sized starch-capped silver nanoparticles, *Materials Letters* 106: 332–336 .
- PranotoY, RakshitSK, SalokheVM.2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology* 38: 859–865.
- RaveendranP, FuJ, WallenSL. 2003. Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, *J. AM. CHEM. SOC.* 125: 13940–13941.
- RhimJW, ParkHM, HacCS. 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications, *Progress in Polymer Science* 38: 1629–1652
- Zhang Y, Peng H, Huang W, Zhou Y, Yan D.2008. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science* 325: 371–376.
- ZhangY and HanJH.2006. Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols, *Journal of Food Science*7: 1109–1118.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con la ayuda de los proyectos: PICT 2012-1817, PICT 2011-1213 y PICT 2015-0921 (ANPCyT, Argentina) y PVT- Fac. Cs. Exactas UNLP. Florencia Ortega es becaria doctoral de CONICET, M. Alejandra García es investigadora de CONICET, Valeria B. Arce es investigadora de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

