



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

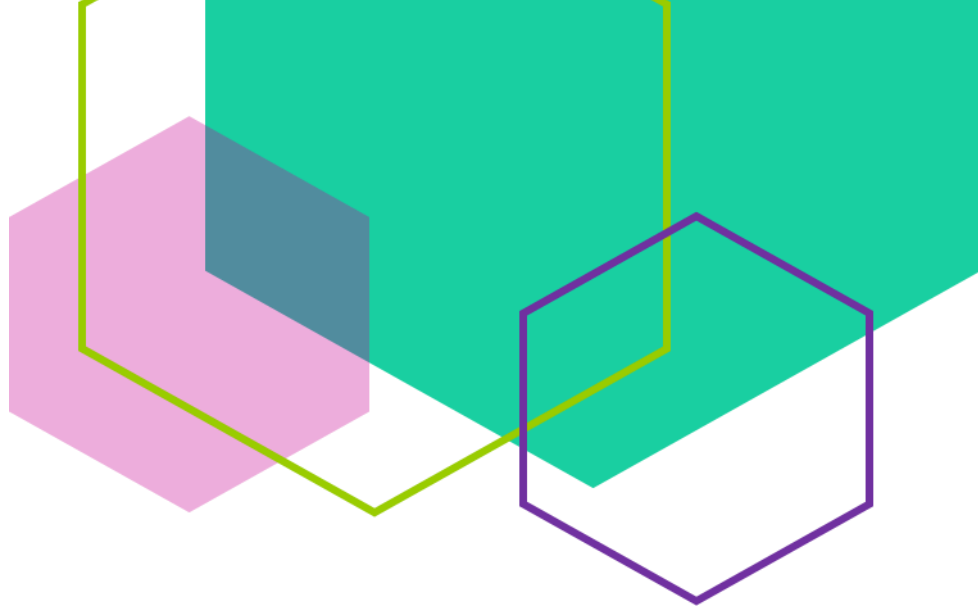
Materiales biodegradables con nanopartículas de plata con capacidad antimicrobiana para mejorar los procesos de conservación de alimentos.

Tesista: Lic. Florencia Ortega

Directoras: Dra. M. Alejandra García

Dra. Valeria B. Arce

Año: 2021



**Materiales biodegradables con
nanopartículas de plata con
capacidad antimicrobiana para
mejorar los procesos de
conservación de alimentos**

**Tesis doctoral de
FLORENCIA ORTEGA**

La Plata, 20 de diciembre de 2021

Abstract geometric design featuring overlapping hexagons. A pink hexagon is partially overlapped by a teal hexagon, which is in turn overlapped by a purple hexagon. A yellow-green line connects the vertices of these hexagons, forming a path across the composition.

El presente trabajo de Tesis para optar por el título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CIC-CONICET, bajo la dirección de la Dra. María Alejandra García y de la Dra. Valeria B. Arce.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis doctoral es el producto de muchos años de trabajo, que fueron posibles gracias a la colaboración, el apoyo y la compañía de muchos. Por ello quiero agradecer a todos los que hicieron posibles que hoy pueda llegar a este momento.

En primer lugar quiero agradecer muy especialmente a mis directoras, Ale y Vale, porque ellas confiaron en mí y me hicieron partícipe de mi plan de Tesis desde el primer día. Me guiaron, no solo en el escritorio, sino también en el laboratorio; me tuvieron paciencia y me regalaron parte de su tiempo cada vez que las necesité. Gracias por tener siempre una palabra de aliento, por su amabilidad y consejos. Me transmitieron sus conocimientos y experiencias que me ayudaron a formarme en lo profesional. Gracias por abrirme las puertas de sus grupos de trabajo y permitirme conocer a mucha gente valiosa y formar parte de ellos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, del CIDCA e INIFTA, gracias por formar parte fundamental de este camino, con ustedes crecí a diario y colaboraron para que este trabajo se haga ameno. Los integrantes de Histología/Vegetales: Yuli, Andre, Flor, Eli, Karen, Marina, Javier, y Alejo. Gracias a todos ustedes por sus charlas, sus mates y su compañía. Incluyo en este agradecimiento a todos los integrantes del *viernes dulce*, con quienes he compartido, mates, charlas y risas, además de ricas comidas. No quiero dejar de mencionar a los chicos del ex LEAR, del INIFTA, a quienes conozco desde mi Trabajo Final de grado, en especial con los que compartí gran cantidad de tiempo y anécdotas: Daniel, Mónica, Vale, María Laura, Gaby, Cristian, Juanjo, Belén, Joaco, Damián, Fran y María Laura. A Juan B., Nati A., Mati, otros compañeros del CIDCA, en los cuales he encontrado nuevos amigos, por su calidez y compañerismo. Gracias especiales a esos con los que la relación trasciende las paredes del labo.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Jessica Minnaard, Fabricio, Meli y resto del grupo de micro por ayudarme, enseñarme, recibirme en su espacio y tenerme paciencia en un mundo nuevo para mí. También quiero incluir a la Dra. Leda Giannuzzi, quien me ayudó a diseñar y llevar a cabo parte de los ensayos microbiológicos.

A los Drs. Jorge L. Jios y Pablo Sobral por colaborar tanto en la medida, como en el análisis del ensayo de migración.

A Fernanda que me ayudó con el procesamiento de las muestra de tracción y compartimos muchos momentos de charlas.

A mis compañeras de box, Aline, Estela y Laura por su agradable compañía, mates y charlas.

A mis compañeros de la cátedra de Bromatología para Bioquímica, quienes me tuvieron mucha paciencia, y especialmente este último tiempo.

A mis papás gracias por todo, por ayudarme y darme fuerzas para seguir adelante en este largo camino, por estar siempre en las buenas...y no tan buenas. Agradezco su gran esfuerzo y enseñarme a ser quién soy. A Loli, mi hermana, por las risas, acompañarme en el día a día, de la noche a la mañana muchos años y ahora a la distancia.

Por último, quiero agradecerle a Luciano, quien me acompaña día a día. Gracias por el apoyo incondicional, la paciencia, por cuidarme, mimarme, escucharme y alentarme.

Los resultados del trabajo de investigación desarrollado derivaron en la escritura de esta Tesis de doctorado titulada MATERIALES BIODEGRADABLES CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA PARA MEJORAR LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS, se hicieron presentaciones en congresos nacionales e internacionales y se publicaron artículos en revistas internacionales con referato.

Películas activas a partir de almidón y nanopartículas de plata para conservación de alimentos. Ortega F., García M.A., Arce V.B. Jornada interdisciplinaria en recubrimientos y materiales de interés biológico, CIDEPINT, 2016, p. 18. ISBN 978-987-46286-0-2.

Envases activos nanocompuestos para la conservación de un producto lácteo. Ortega F., Arce V.B., García M.A. El Estado Del Arte De La Biotecnología Y Microbiología En Los Alimentos, VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2016 – Córdoba, Argentina, pp. 141 – 148. Resumen Completo, con referato. ISBN 978-987-45380-3-1.

Estudio del contenido de almidón en el desarrollo de películas nanocompuestas. Florencia Ortega, Valeria B. Arce y M. Alejandra García. XII simposio argentino de polímeros, 2017. Actas en formato digital, Tópico Nanomateriales, polímeros nanoestructurados y nanocompuestos, p. 150.

Películas nanocompuestas a base de almidón de maíz: efecto del tipo de síntesis de nanopartículas de plata. F. Ortega, V. B. Arce y M. A. García. Biopoli 2018 – III Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompuestos, 2018. Con referato. Actas en formato digital.

Efecto de la incorporación de nanopartículas de plata con jugo de limón sobre películas de almidón de maíz nativo. Ortega Florencia, Valeria B. Arce, M. Alejandra García. XXI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, 2019. Actas en formato digital.

Films antimicrobianos de almidón conteniendo nanopartículas de plata sintetizadas con jugo de limón (citrus limon). Florencia Ortega, M. Alejandra García, Valeria B. Arce. XIII Simposio Argentino de Polímeros, SAP 2019, octubre de 2019. Actas en formato digital. Con referato.

Estudio del contenido de AgNPs obtenidas por diferentes métodos en materiales de almidón de maíz usados como envases de alimentos. Ortega Florencia, García M. Alejandra, Arce Valeria B. XXII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, CAFQI, abril de 2021. Actas en formato digital. Con referato.

Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. Ortega, Florencia; Giannuzzi, Leda; Arce, Valeria B.; García, M. Alejandra. Food Hydrocolloids, 2017, **70**, 152 - 162. ISSN: 0268-005X.

Nanocomposite films with silver nanoparticles synthesized in situ: Effect of cornstarch content. Ortega, Florencia; García, M. Alejandra; Arce, Valeria B. Food Hydrocolloids, 2019, **97**, 105200. ISSN: 0268-005X.

Silver nanoparticles synthesis using lemon juice and its inclusion in nanocomposite starch-based films. Ortega, Florencia; Arce, Valeria B.; García, M. Alejandra. Carbohydrate Polymers, 252, 117208. ISSN: 0144-8617.

Biobased composite materials from agro-industrial wastes and by-products. Ortega, F., Versino, F., López, O.V. et al. Emergent Mater. (2021). <https://doi.org/10.1007/s42247-021-00319-x>

RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) directamente en la matriz polimérica de almidón de maíz nativo, mediante una metodología simple, de fácil implementación, caracterizando las mismas mediante técnicas espectrofotométricas y de microscopía electrónica. El uso de almidón de maíz como estabilizador permitió acoplar la síntesis de AgNPs a la suspensión filmogénica y así, obtener películas nanocompuestas en pocos pasos, optimizando tanto el tiempo de procesamiento como el consumo de energía y reactivos. Los procesos de acoplamiento requieren un ajuste previo de las concentraciones de los reactivos y los tiempos de reacción para obtener las AgNPs en la suspensión filmogénica. Finalmente se obtuvieron materiales nanocompuestos, sin que se vea afectada la capacidad filmogénica de la suspensión de almidón. Fueron evaluadas las propiedades ópticas, mecánicas, de barrera, y antimicrobianas de las películas desarrolladas. Las películas obtenidas con diferentes concentraciones de AgNPs (0; 14,3; 28,6; 71,5 y 143 ppm) resultaron homogéneas e incoloras a simple vista. A continuación se estudió el efecto del contenido de almidón de maíz nativo (1; 3 y 5% p/v) en el desarrollo de materiales nanocompuestos con 143 ppm de AgNPs sintetizadas *in situ*. Las concentraciones ensayadas permitieron sintetizar los AgNP *in situ* y las suspensiones mantuvieron su capacidad filmógena, independientemente del contenido de almidón. Las películas con 1% de almidón, fueron difíciles de manipular. Las películas nanocompuestas con 5% de almidón mostraron mejores propiedades mecánicas y de barrera debido al aumento del contenido de almidón, pero no evidenciaron un refuerzo de la matriz por la incorporación de AgNPs, mientras que las películas con un 3% de almidón mostraron propiedades mecánicas y de barrera óptimas, atribuidas al refuerzo de los AgNP. En cuanto a la capacidad antimicrobiana, todas las películas nanocompuestas inhibieron el crecimiento de microorganismos. Por último se evaluó el potencial de los materiales obtenidos como posible envase activo, el cual puede prolongar la vida útil de los alimentos. Con este fin se seleccionó un producto

alimenticio fresco de humedad intermedia, como es el queso. Para ello fue preciso evaluar el desarrollo microbiano luego del almacenamiento en condiciones adecuadas.

Por otro lado se optimizó la síntesis de nanopartículas de plata utilizando los compuestos activos del jugo de limón (AgNP L). Las nanopartículas obtenidas se incluyeron de manera eficiente en las formulaciones de películas a base de almidón, estudiando las propiedades relevantes que condicionan su aplicación en el área de envasado. Las películas nanocompuestas resultaron con un tono anaranjado el cual se vio incrementado con la concentración de AgNP L (14,3 - 143 ppm). Al igual que para las películas con nanopartículas de plata obtenidas *in situ*, se pudieron evaluar las propiedades ópticas, mecánicas y de barrera de los nuevos materiales. Tanto la permeabilidad al vapor de agua como la resistencia mecánica a la tracción se vieron mejoradas por la incorporación de 71,5 ppm de AgNP L, lo que indica el refuerzo de la matriz polimérica. Además, el contenido de ácido cítrico proporcionado por el jugo de limón también afectó las propiedades relevantes de la película a base de almidón. En cuanto a la capacidad antimicrobiana, se evidenció un efecto sinérgico entre los compuestos activos del jugo de limón y las nanopartículas de plata, siendo *Salmonella spp.* las bacterias más sensibles. Estos materiales nanocompuestos se utilizaron como separadores para extender la vida útil de pan lacteado fresco en rodajas.

Aplicando un mecanismo de síntesis verde *top-down* se obtuvieron nanopartículas de plata asistidas por ablación láser en medio líquido (AgNP F). Las AgNP F fueron sintetizadas en una suspensión de almidón utilizando un láser de Ti:Za (Titanio:Zafiro) de pulsos ultracortos. Por microscopía de transmisión electrónica se determinó el diámetro medio de las nanopartículas siendo de 6 nm con morfología esférica. Una vez caracterizadas fueron incluidas en suspensiones filmogénicas de almidón de maíz al 3 % de forma tal de obtener películas nanocompuestas con una concentración final de Ag de 143 ppm. Para el desarrollo de los materiales se utilizó la técnica de *casting*. La inclusión de las AgNP F no afectó la capacidad filmogénica de las formulaciones. Las películas fueron homogéneas, no presentaron grietas ni

poros a la observación por microscopía electrónica de barrido, pero resultaron de un color amarillo intenso.

Las propiedades relevantes estudiadas para la aplicación de los materiales nanocompuestos como envases de alimentos fueron, *citotoxicidad, migración y biodegradabilidad*. El ensayo de citotoxicidad indicó que las películas conteniendo AgNPs obtenidas por ablación láser resultaron ser las más tóxicas, ya que disminuían la viabilidad celular en aproximadamente un 70% para las células Caco-2 y en un porcentaje menor para las células Vero. Por este motivo se descartaron para su posible aplicación como envases de alimentos. La exposición a NPs afecta también a las líneas fagocíticas como macrófagos. El estudio del efecto de las películas nanocompuestas sobre la línea THP-1 diferenciada a macrófagos indicó que después de las AgNP F, las AgNP sintetizadas *in situ* fueron las que más afectaron su viabilidad. En general, el efecto citotóxico de las nanopartículas y materiales nanocompuestos depende fuertemente del tamaño de las NPs, su potencial Z y agente de recubrimiento.

Los modelos aplicados al estudio de la migración de plata desde las películas nanocompuestas hacia los simulantes seleccionados (agua, ácido acético 3% y etanol 15 %), indicaron que la liberación de Ag ocurría más fácilmente desde las muestras con AgNP L. Sin embargo, el análisis del contenido de plata liberado en función del tiempo demostró que esta concentración era menor que para el caso de las películas con AgNP sintetizadas *in situ*. Si bien se pudo cuantificar el contenido de metal liberado éste fue menor a lo estipulado por la norma de la Unión Europea (Reglamento de la UE n° 10/2011).

La biodegradación de los materiales se vio afectada por la incorporación de nanopartículas, sin embargo tanto las películas con AgNPs *in situ*, como las que contenían AgNP L se degradaron en un porcentaje $\geq 50\%$ al cabo de 90 días.

Finalmente se estudió la aplicación de las películas nanocompuestas en el área de alimentos. Se desarrollaron envases activos por termosellado de los materiales conteniendo AgNP *in situ* (143 ppm) los cuales permitieron extender la vida útil en

7 días en quesos de pasta blanda. Las películas nanocompuestas con agregado de 71,5 ppm de AgNP L se utilizaron como separadores de rebanadas de pan lacteado. Por último, se evaluaron los costos de producción y el marco legislativo vigente que contempla a este tipo de materiales, siendo necesario aún avanzar en este sentido.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES	3
1.1. Nanopartículas de plata (AgNPs)	4
1.2. Métodos de síntesis verde de nanopartículas	6
1.3. Migración y toxicidad de las AgNPs	10
2. BIOMATERIALES	12
2.1. Películas a base de polisacáridos	12
2.2. Biomateriales en aplicaciones alimentarias	13
2.3. Biopolímeros nanocompuestos	16
OBJETIVOS GENERALES	22

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN	23
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Síntesis y caracterización de las AgNPs in situ	25
3.2. Caracterización de la suspensión nanocompuesta	27
3.2.1. Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-vis)	27
3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	27
3.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	29
3.2.4. Potencial Z	30
3.3. Desarrollo de las películas nanocompuestas	33
3.4. Técnicas de caracterización aplicadas a los materiales desarrollados	35
3.4.1. Espesor de las películas	35
3.4.2. Propiedades ópticas: color, capacidad de barrera al UV-vis, opacidad y/o transparencia	35
3.4.2.1. Color	36
3.4.2.2. Capacidad de barrera UV, opacidad y transparencia	37

3.4.3. Permeabilidad al vapor de agua	37
3.4.4. Solubilidad y contenido de humedad	39
3.4.5. Propiedades mecánicas	40
3.4.6. Capacidad de termosellado	41
3.4.7. Caracterización microestructural	43
3.4.7.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	43
3.4.7.2. Espectroscopía de difracción de rayos X	44
3.5. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas	46
3.5.1. Preparación de los inóculos	47
3.5.2. Determinación de la capacidad antimicrobiana	47
3.6. Efecto del contenido de almidón sobre matrices nanocompuestas conteniendo AgNPs	48
3.6.1. Síntesis de nanopartículas de plata acoplada a la suspensión filmogénica	48
3.6.2. Caracterización de las suspensiones filmogénicas	48
3.6.2.1. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)	48
3.6.2.2. Potencial Z	49
3.6.2.3. Caracterización reológica de las suspensiones filmogénicas	49
3.6.2.4. Cinética de secado	50
3.6.3. Caracterización de las películas	51
3.7. Aplicación de las películas activas desarrolladas sobre alimentos	51
3.8. Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1. Caracterización de las nanopartículas	53
4.2. Obtención de las películas nanocompuestas	58
4.3. Caracterización de las películas desarrolladas	59
4.3.1. Determinación del espesor	59
4.3.2. Propiedades ópticas	59
4.3.3. Permeabilidad al vapor de agua	63
4.3.4. Solubilidad y contenido de humedad	65
4.3.5. Propiedades mecánicas	65
4.3.6. Capacidad de termosellado de los materiales	70

4.3.7. Caracterización microestructural de las películas	72
4.3.71. FTIR	72
4.3.7.2. Difracción de rayos X	75
4.4. Evaluación de la capacidad antimicrobiana	78
4.5. Efecto del contenido de almidón sobre matrices nanocompuestas conteniendo AgNPs	81
4.5.1. Síntesis de nanopartículas de plata in situ	81
4.5.2. Caracterización reológica de las suspensiones filmogénicas.	85
4.5.3. Películas nanocompuestas	86
4.5.3.1. Cinética de secado	86
4.5.3.2. Propiedades ópticas	88
4.5.3.3. Propiedades mecánicas de las películas	89
4.5.3.4. Caracterización microestructural de las películas	92
4.5.3.4. Propiedades de las películas nanocompuestas relacionadas con el agua	94
4.5.4. Capacidad antimicrobiana de las películas nanocompuestas	96
4.5.5. Aplicación de las películas activas desarrolladas como envases para alimentos	99
5. CONCLUSIONES	101

CAPÍTULO 2

1. INTRODUCCIÓN	104
2. LOS OBJETIVOS PLANTEADOS EN EL PRESENTE CAPÍTULO FUERON:	107
3. MATERIALES Y MÉTODOS	108
3.1. Obtención del jugo de limón	108
3.2. Caracterización del jugo de limón obtenido	108
3.2.1. Sólidos solubles totales (SST)	108
3.2.2. Acidez titulable	109
3.2.3. Densidad	109
3.2.4. Contenido de azúcares reductores	110
3.2.5. Cuantificación de ácido ascórbico	111
3.2.6. Contenido de polifenoles	111
3.3. Síntesis y caracterización de las AgNP L	112

3.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	112
3.3.2. Potencial Z	113
3.3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	113
3.4. Estabilidad de las AgNP L obtenidas a las diferentes temperaturas	113
3.5. Películas nanocompuestas de almidón de maíz conteniendo AgNP L y su caracterización	114
3.5.2.1. Color superficial	116
3.5.2.2. Capacidad de termosellado	116
3.5.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	116
3.5.2.4. Espectroscopía de difracción de rayos X (DRX)	117
3.5.2.5. Calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC)	117
3.5.2.6. Micro-espectroscopía Raman	117
3.6. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas desarrolladas	118
3.7. Aplicación de las películas nanocompuestas desarrolladas como separadores de rebanadas de pan	118
3.8. Análisis estadístico	119
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	120
4.1. Caracterización del jugo de limón	120
4.2. Obtención de las AgNP L	122
4.3. Películas nanocompuestas con incorporación de las AgNP L sintetizadas	130
4.3.1. Propiedades ópticas: color superficial y capacidad de barrera al UV	132
4.3.2. Solubilidad en agua a 25 y 100 °C	136
4.3.3. Propiedades de barrera al vapor de agua	138
4.3.4. Propiedades mecánicas	139
4.3.5. Capacidad de termosellado de los materiales desarrollados	142
4.3.6. Caracterización microestructural	144
4.3.6.1. Microscopía electrónica de barrido	144
4.3.6.3. Difracción de rayos X	151
4.3.6.3. Caracterización de los materiales por MDSC	152
4.3.6.4. Caracterización de los materiales por espectroscopía Raman	153
4.3.7. Capacidad antimicrobiana	156

4.4. Aplicación de las películas desarrolladas como separadores de pan lacteado	158
5. CONCLUSIONES	161

CAPÍTULO 3

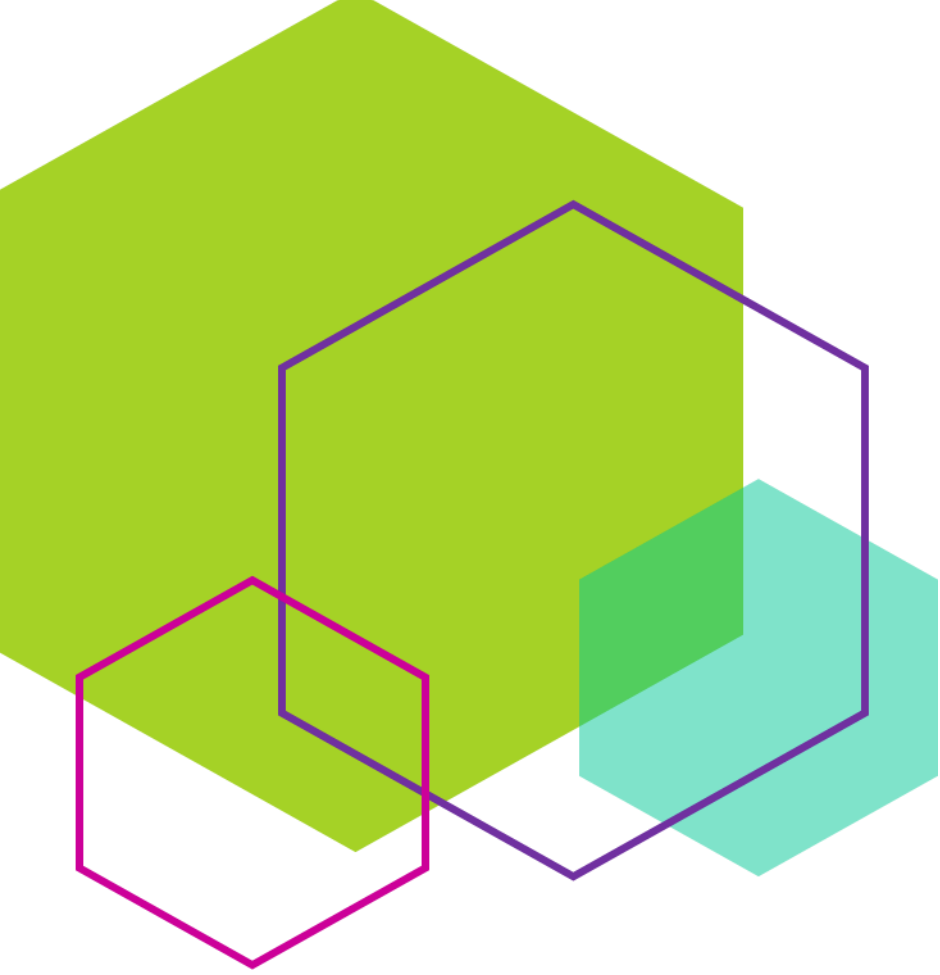
1. INTRODUCCIÓN	163
2. LOS OBJETIVOS PROPUESTOS EN ESTE CAPÍTULO FUERON:	166
3. MATERIALES Y MÉTODOS	166
3.1. Preparación y caracterización de las AgNP F	166
3.1.1. Espectroscopía de absorción UV-visible	169
3.1.2. Potencial Z	169
3.1.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	169
3.1.4. Espectroscopía Raman	169
3.1.5. Espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)	170
3.2. Desarrollo de películas de almidón de maíz nanocompuestas con AgNP F	170
3.3. Técnicas de caracterización aplicadas a las películas nanocompuestas	171
3.4. Estudio de la citotoxicidad de las películas conteniendo AgNP F	172
3.4.1. Evaluación de la viabilidad celular mediante la determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial	173
3.5. Análisis estadístico	175
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	175
4.1. Síntesis y caracterización de las AgNP F	175
4.2. Caracterización microestructural de las películas con incorporación de AgNP F	180
4.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	180
4.2.2. Difracción de rayos X	184
4.2.3. Microscopía electrónica de barrido	185
4.3. Caracterización de las películas nanocompuestas	186
4.3.1. Propiedades ópticas	186
4.3.2. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	189

4.3.3. Solubilidad	190
4.3.4. Propiedades mecánicas	191
4.4. Evaluación de la viabilidad celular mediante la determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial	192
4.5. Análisis por componentes principales del efecto de la técnica de obtención de las AgNPs en las propiedades de los materiales nanocompuestos	194
5. CONCLUSIONES	195

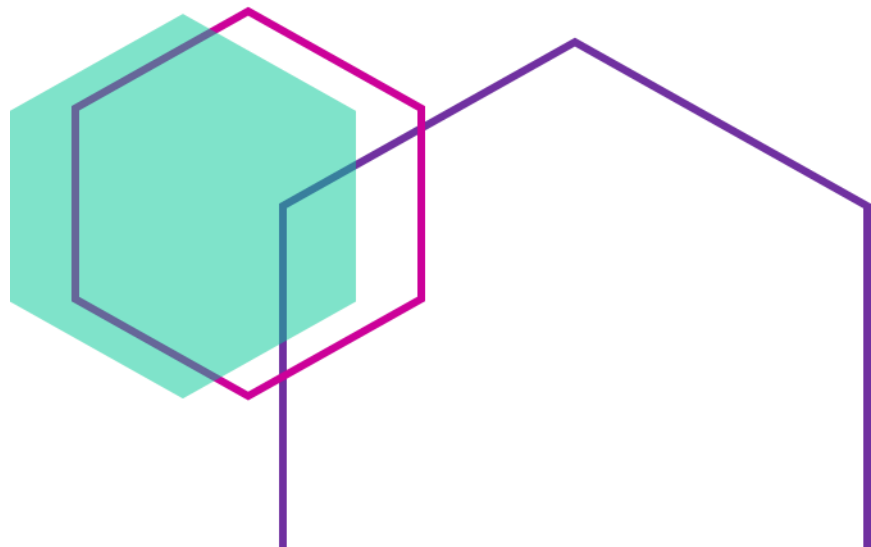
CAPÍTULO 4

1. INTRODUCCIÓN	197
2. OBJETIVOS	203
3. MATERIALES Y MÉTODOS	204
3.1. Toxicidad de los materiales nanocompuestos, migración, y biodegradación	204
3.1.1. Toxicidad de los materiales nanocompuestos	204
3.1.1.1. Evaluación de la viabilidad mediante la determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial	205
3.1.1.2. Evaluación de la viabilidad mediante tinción con yoduro de propidio	206
3.1.2. Evaluación de la migración de nanopartículas a simulantes alimentarios	208
3.1.3. Evaluación de la biodesintegración de las películas en suelo	213
3.1.3.1. Germinación de semillas	215
3.2. Análisis estadístico	216
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	216
4.1. Toxicidad de los materiales nanocompuestos	216
4.1.1. Evaluación de la viabilidad mediante determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial	216
4.1.2. Evaluación de la viabilidad mediante tinción con yoduro de propidio	221
4.1.3. Análisis por componentes principales del efecto de la técnica de obtención de las AgNPs en la citotoxicidad de los materiales nanocompuestos	223
4.2. Estudio de la migración de las nanopartículas de plata hacia simulantes alimentarios	224
4.3. Evaluación de la biodesintegración de las películas en suelo	238
4.3.1. Ecotoxicidad del compost	242

4.4. Análisis por componentes principales de la integración de las propiedades que condicionan el uso de los materiales nanocompuestos	243
4.5. Evaluación de costos de producción materiales nanocompuestos y legislación vigente	247
4.5.1. Evaluación de los costos de producción	247
4.5.2. Legislación Vigente	250
5. CONCLUSIONES	254
<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	<u>192</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>259</u>



INTRODUCCIÓN



1. NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES

La nanotecnología ha llegado a muchos productos de consumo cotidiano y a los polímeros en contacto con los alimentos en las últimas dos décadas debido al potencial de que los nanoaditivos pueden mejorar ciertas propiedades de los polímeros puros o introducir nuevas funcionalidades (Mihindukulasuriya y Lim, 2014).

Los nanomateriales utilizados como aditivos en polímeros para aplicaciones de envasado de alimentos o utensilios de cocina suelen incorporarse a la matriz del polímero y pueden considerarse incluidos en la matriz del producto (Störmer, Bott, Kemmer, y Franz, 2017).

Según lo publicado por Bumbudsanpharoke y Ko (2015) en su trabajo sobre *“empaques nano-alimentarios”*, la plata en su forma nanométrica se incorpora en envases o contenedores de alimentos para conferirles propiedades antimicrobianas y, actualmente se encuentran disponibles en el mercado de todo el mundo una gran cantidad de envases de alimentos antimicrobianos conteniendo especies nano de plata. Por ejemplo ya están disponibles en el mercado los siguientes: Window® contenedores de alimentos con nano-plata, Dokdo Anti-Bacterial Food Storage Container, Everin® Food Fresher Longer™ Containers Nano Silver Airtight, y Miracle Food Storage and Plastic Bag. En las especificaciones y *brochures* de estos productos se afirma que la nano-plata ayuda a reducir efectivamente el crecimiento de bacterias y a mantener el producto fresco por más tiempo.

La pregunta crucial para la que hasta ahora no siempre se han reportado y publicado respuestas concurrentes es si las nanopartículas de estos nanoaditivos podrán moverse dentro de los nanocompuestos poliméricos (PNC) a la superficie de contacto con los alimentos y liberarse desde allí a los alimentos. Básicamente, esto podría ser una migración a través de la difusión Fickiana como con los aditivos poliméricos convencionales u otros mecanismos basados en el estrés del material, como la degradación de la matriz del polímero por abrasión mecánica, fatiga del

material, exposición a los rayos UV, hidrólisis o interacciones de hinchamiento (Noonan, Whelton, Carlander, y Duncan, 2014).

1.1. Nanopartículas de plata (AgNPs)

Las AgNP han impulsado numerosas investigaciones debido a su conductividad eléctrica, alta estabilidad y especialmente por su actividad antimicrobiana (Cheviron, Gouanvé, y Espuche, 2014; Prathna, Chandrasekaran, Raichur, y Mukherjee, 2011). Pueden sintetizarse mediante reducción química (Cheng, Betts, Kelly, y Hector, 2015; Cheng, Betts, Kelly, Schaller, y Heinze, 2013; Cheviron y col., 2014), ablación con láser (Arboleda y col., 2018; Arce y col., 2017), eléctrica y fotoquímica (Prathna, Raichur, Chandrasekaran, y Mukherjee, 2014). La reducción química de una sal de plata, principalmente con reactivos orgánicos, es el método más utilizado y rentable para la síntesis a gran escala (Masala y Seshadri, 2004). Además, la morfología y el tamaño de las nanopartículas se pueden controlar mediante síntesis química dependiendo del agente de *capping* y estabilización.

Actualmente hay un creciente uso de la plata como eficaz agente antibacteriano y antifúngico, e incluso antiviral, por lo cual se la ha incluido en una gran variedad de productos para el cuidado de heridas que se encuentran disponibles comercialmente. En el ámbito médico, se incluye Ag en instrumental quirúrgico, tratamientos dentales, prótesis óseas, catéteres, entre otros. Otra aplicación es la síntesis de compuestos para su uso en filtros de desinfección de agua. La plata también está apareciendo con mayor frecuencia en productos textiles, cosméticos, e incluso electrodomésticos (Lara, Garza-Treviño, Ixtepan-Turrent, y Singh, 2011).

Además, las AgNPs también tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en el envasado de los alimentos, disminuyendo el crecimiento de microorganismos en la superficie de los mismos (www.foodpackagingforum.org), siendo una alternativa a otros métodos de conservación de alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos específicos en estos alimentos. Estas NPs pueden aplicarse incorporadas en la formulación de un recubrimiento

biodegradable en los frutos, mediante la inmersión de los mismos en la solución filmogénica.

Las nanopartículas de plata han demostrado ser biocidas eficaces contra:

- a. Bacterias tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Kim y col., 2007; Lara y col., 2011; Sondi y Salopek-Sondi, 2004).
- b. Hongos como *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Penicillium citrinum* y levaduras como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, (Kim y col., 2008; Zhang, Peng, Huang, Zhou, y Yan, 2008).
- c. Virus tales como el de la hepatitis B y el VIH-1. Para el caso del virus del VIH-1, ha sido demostrado que en el tratamiento in vitro con AgNPs interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped. Para el virus de la hepatitis B, las AgNPs podrían unirse al ADN del virión o inhibir la síntesis de ARN (Lara y col., 2011; Morones y col., 2005).

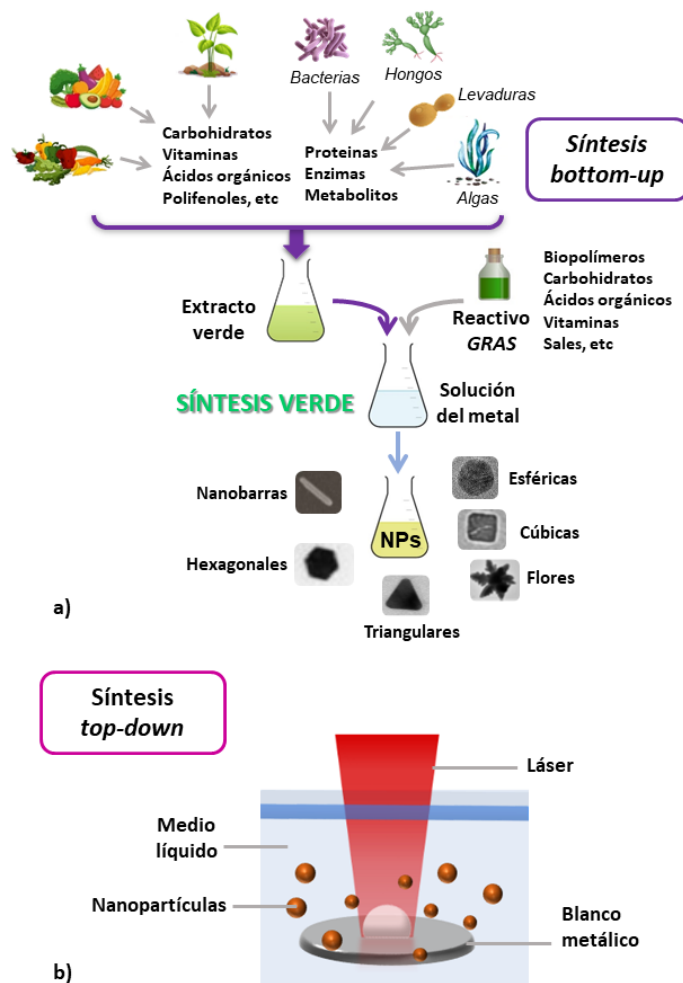


Figura 2: Técnicas de síntesis verde de AgNPs, a) *bottom-up* y b) *top-down*.

1.2. Métodos de síntesis verde de nanopartículas

Las partículas de tamaño nanométrico se caracterizan por su alta relación superficie/volumen, lo que les confiere características excepcionales. Se sintetizan a través de métodos físicos, químicos o biológicos, que se clasifican en síntesis *top-down* (de arriba hacia abajo) y *bottom-up* (de abajo hacia arriba) con respecto a si los reactivos son inorgánicos o se generan a partir de la descomposición de un material macroscópico por algún agente externo (Figura 2). Varios métodos físicos y químicos como el hidrotermal, síntesis sol-gel, ablación láser o litografía, entre otros, requieren equipo especial y mano de obra calificada (Jayachandran, Aswathy, y Nair, 2021; Yao, Chan, y Wang, 2002; Yin y col., 2004). Además, algunas de estas técnicas requieren el uso de reactivos tóxicos que presentan riesgos para la salud y el medio ambiente (Barth, Costantini, y Kern, 2009; Jayachandran y col., 2021). Por

ejemplo, las nanopartículas de plata (AgNP) pueden obtenerse mediante la reducción de una sal de plata utilizando reductores fuertes como el borohidruro de sodio, que es un agente extremadamente irritante y corrosivo con un alto riesgo de inflamabilidad (Pinto y col., 2010). En la actualidad, la **química verde** tiene como objetivo la eliminación total o parcial de los residuos químicos y la implementación de reactivos no tóxicos, solventes ambientalmente aceptables y materiales renovables, obteniendo productos con alta estabilidad térmica, baja volatilidad y una producción rentable (Martínez-Abad, Lagarón, y Ocio, 2014; Oluwafemi, Vuyelwa, Scriba, y Songca, 2013; Raghavendra, Jung, Kim, y Seo, 2016; Raveendran, Fu, y Wallen, 2003). Estas técnicas más ecológicas no solo reducen el uso de sustancias peligrosas, sino que también emplean compuestos naturales y renovables como polisacáridos, proteínas o derivados de extractos vegetales (principalmente hojas, raíces y flores) y microorganismos como bacterias, hongos y algas como agentes reductores o protectores (Nasrollahzadeh, Mahmoudi-Gom Yek, Motahharifar, y Ghafori Gorab, 2019; Nasrollahzadeh, Sajadi, Babaei, y Maham, 2015; Ren, Yang, Wang, y Wang, 2016; Rolim y col., 2019). Por tanto, los tres conceptos principales para la obtención de nanopartículas mediante síntesis verde son la elección del disolvente (preferiblemente agua), un agente reductor ecológico, *GRAS* (sustancias generalmente reconocidas como seguras) o reactivos naturales, y un material no tóxico para la estabilización de nanopartículas (es decir, biopolímeros). Los productos de origen natural contienen en su estructura compuestos fenólicos, azúcares reductores y compuestos nitrogenados, entre otros, que pueden reducir los cationes metálicos para generar nanopartículas, y en ciertos casos también pueden actuar como estabilizadores (Figura 1a). A su vez, la implementación de estos compuestos también resulta ventajosa desde el punto de vista económico ya que no requieren altas temperaturas y elevado consumo energético. En la Tabla 1.1 se puede ver la variedad de métodos de síntesis verde para la obtención de nanopartículas.

Tabla 1: Técnicas de síntesis verde de nanopartículas. Adaptada de Ortega, Versino, López, y García, (2021).

Nanopartículas	Técnica de síntesis verde	Forma	Tamaño (nm)	Referencias
Ag	Maltosa como agente reductor y almidón como estabilizante	Esféricas con alta monodispersidad	5	Oluwafemi y col., (2013)
Ag	Asistida con microondas usando cascara de naranja	Nanoesferas	7,36 ± 8,06	Kahrilas y col., (2014)
Ag	Síntesis <i>in vivo</i> en plantas: <i>Brassica juncea</i> , <i>Festuca rubra</i> y <i>Medicago sativa</i>	Variable	Variable	Marchiol y col., (2014)
Ag	Usando algas marinas, <i>Caulerpa racemosa</i>	Esféricas con algunas nanopartículas triangulares	10 nm en promedio	Kathiraven y col., (2015)
Ag	Maltosa como reductor y almidón de maíz como estabilizante	Esféricas	5 - 20	Ortega, y col., (2017)
Ag	Maltosa como reductor y diferentes concentraciones de almidón de maíz como estabilizante	Esféricas	13,4-19,9	Ortega y col., (2019)
Ag	Jugo de limón como reductor y agente estabilizante	Esféricas	5,5-13,5	Ortega y col., (2021)
Au	Usando extractos acuosos de frutas: <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus reticulata</i> and <i>Citrus sinensis</i> .	Formas varias	15-80	Sujitha y Kannan, (2013)
Au	Usando la alga marron, <i>Cystoseira baccata</i>	Esféricas	8,4±2,2	González-Ballesteros y col., (2017)
Au	Usando extracto de hoja de <i>Lawsoniainermis</i>	Esféricas	~ 20	Kumari y Meena, (2020)
Au	Utilizando una cepa endofítica <i>Fusarium solani</i> , se ha aislado ATLOY - 8 de la planta <i>Chonemorpha fragrans</i> .	Estructuras de agujas y flores	40-45	Clarance y col., (2020)
CoO	Complejamiento y pasivación superficial con almidón	Cuadradas	15-30	Nidhin y col., (2012)
Co ₃ O ₄	Usando extracto de plantas <i>Calotropis gigantea</i>	Esféricas	50-60	Sharma y col., (2015)
CoO	Usando extractos de <i>P. granatum</i>	Esféricas	40-80	Bibi y col., (2017)
Co ₃ O ₄	Extracto de piel verde de nuez como agente reductor y estabilizante	Esféricas	60-80	Mohammadi y col., (2021)
CoO/Co ₃ O ₄	Extracto de romero	Láminas	~ 100	Raeisi y col., (2021)
Cu/Cu ₂ O	Sintetizado por ablación láser de cobre en agua	Esféricas y se autoensamblan formando una especie de cactus	2-7	Swarnkar y col., (2011)

Cu	Usando carboximetilcelulosa como agente de <i>capping</i>	Esféricas	5,5 ± 0,5	Manoj y col., (2018)
CuO	Síntesis mediada por ácido cítrico utilizando extractos de corteza de canela	Esféricas	50-300	Sarwar y col., (2021)
Cu	Síntesis mediada por microondas utilizando extracto acuoso de fruta, <i>Citrus sinensis</i>	Forma circular	6,93-20,70	Jahan y col., (2021)
Fe	Usando extracto de hojas de <i>Eucalyptus Tereticornis</i>	Cúbicas	40-60	Wang (2013)
Fe ₃ O ₄	Usando extracto de <i>Aloe vera</i>	Estructura cúbica	6-30	Phumying y col., (2013)
Fe ₂ O ₃ /Fe ₃ O ₄	Por ablación láser con diferentes valores de energía.	Esféricas y aglomerados	14,9-18,7	Rivera-Chaverra y col., (2020)
MgO	Usando bacterias	Cúbicas	30	Mohanasrinivasan y col., (2018)
MgO	Usando extractos de plantas <i>Costus pictus D. Don</i> como agente reductor	Hexagonal	~ 50	Suresh y col., (2018)
MnO ₂	Usando jugo de limón y extracto de las cáscaras	Aglomerados con jugo y nanorods con extracto de cáscara	<10 nm y nanorods de 8,8 nm	Hashem y col., (2018)
TiO ₂	Usando extracto acuoso de <i>Solanum trilobatum</i>	Esférico desigual y ovalado	70	Rajakumar y col., (2014)
TiO ₂	Frijoles de Bengala (<i>Cicer arietinum L.</i>)	Esféricas	~14	Kashale y col., (2014)
TiO ₂	Usando extractos de hojas de <i>Jatropha curcasL.</i>	Esféricas	13	Goutam y col., (2018)
TiO ₂	Usando extractos de cáscaras de limón	Esféricas	80-140	Nabi y col., (2020)
ZnO	Zn(NO ₃) ₂ como precursor y extracto de hojas de <i>Cayratia pedata</i> como reductor	Aglomerados	52,24	Jayachandran y col., (2021)
ZnO	Combinación de técnica sol-gel con crecimiento hidrotérmal, utilizando hidróxido de tetrametilamonio como agente director de la estructura	Nanorods	ancho 15 nm, y largo 236 nm	Guz y col., (2017)
ZnO	Ablación con láser utilizando una solución de almidón como agente controlador y estabilizador	Esféricas	6-28	Zamiri y col., (2012)

Varios autores han informado que las AgNP esféricas y pequeñas obtenidas mediante un proceso químico completamente verde muestran buenas propiedades antimicrobianas incluso cuando se utilizan en concentraciones bajas (Abreu y col., 2015; Cheng y col., 2013; Cheviron y col., 2014). Ortega, Giannuzzi, Arce, y García, (2017) han acoplado con éxito la síntesis de AgNPs con suspensiones filmógenas a base de almidón de maíz para desarrollar películas de nanocompuestas.

La formación de AgNPs se evidencia por la resonancia de plasmón de superficie característica (SPR) entre 420 y 445 nm (Slistan-Grijalva y col., 2005). Varios autores han sintetizado nanopartículas de plata utilizando jugo de limón, las cuales fueron esféricas con diámetros de alrededor de 20 nm según lo observado por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM), exhibiendo carga negativa considerando las medidas de potencial Z (Mohapatra, Kaintura, Singh, Kuriakose, y Mohapatra, 2015; Ortega, Arce, y Garcia, 2021; Prathna y col., 2011, 2014).

1.3. Migración y toxicidad de las AgNPs

El desarrollo de la nanotecnología, tiene que ir acompañado de estudios de toxicidad que permitan conocer los efectos que las NPs van a tener tanto en la salud humana como en el medio ambiente (Figura 2). Actualmente no se cuenta con ninguna legislación específica sobre productos derivados de la nanotecnología, es por eso que se necesita desarrollar, mejorar y validar métodos de rutina para estudiar en profundidad la toxicidad de las NPs, ya que hay un incremento del uso de nanomateriales en el mercado. Teniendo en cuenta el tipo de material desarrollado que incluya NPs, el tamaño de las mismas y si van a ingerirse, entonces serían necesarios estudios de toxicidad y genotoxicidad apropiados.

En 2012, la EFSA (European Food Safety Authority) publicó su informe anual sobre la evaluación de riesgos de los nanocompuestos en alimentos destinados al consumo humano y alimentos balanceados para animales, con el fin de profundizar en el análisis del riesgo asociado a la nanotecnología en la Unión Europea. Si bien este informe ha sido un avance aún se encuentra en la fase de recopilación de datos, y no se puede llevar a cabo una evaluación del riesgo general del uso de las nanotecnologías en el contexto de la salud pública. Las medidas necesarias deberían

incluir pruebas toxicológicas especialmente adaptadas, reglamentación sobre la introducción de productos en el mercado y adoptar normas de etiquetado en productos de consumo.

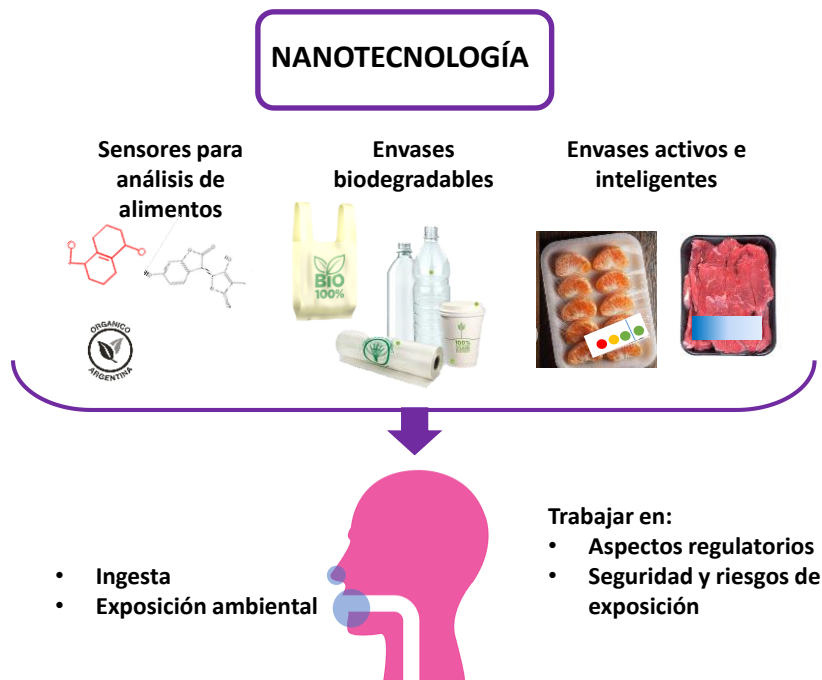


Figura 2: Resumen de las aplicaciones de la nanotecnología en el sector alimentario

Varios documentos orientan sobre cómo establecer la migración de diferentes componentes desde los materiales en contacto con los alimentos, pero no siempre cubren, específicamente, a los nanomateriales (Störmer y col., 2017). Los documentos más aplicados son el Reglamento 10/2011 (2011) sobre plásticos de la Unión Europea, en donde se establece el ensayo que simula el almacenamiento a largo plazo con productos alimenticios acuosos y grasos y la Guía para la industria de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA de EE. UU.), sobre la preparación de presentaciones previas a la comercialización para sustancias en contacto con alimentos. El documento correspondiente a la UE aborda la problemática de los nanomateriales solo en plásticos, mientras que el de la FDA, no considera específicamente a los nanomateriales, pero incluye a cualquier tipo de material de envasado.

2. BIOMATERIALES

La mayoría de los envases de plástico se basan actualmente en productos petroquímicos, y el 4% de todo el petróleo usado se convierte en 240 millones de toneladas de plástico al año. Se han utilizado muchos tipos de polímeros básicos y especiales en los materiales de envasado, siendo las principales ventajas su peso liviano, la posibilidad de adaptarse a un producto en particular y su precio relativamente bajo, por lo que incluso en envases de alimentos constituye menos más del 10% del precio del producto final. Los envases de plástico convencionales tienen problemas asociados de eliminación, tirar basura (incluida la contaminación del océano), reutilización y reciclaje, debido a la tasa muy lenta de degradación ambiental y la falta de infraestructura de recolección y reciclaje en muchos países. Los materiales poliméricos de base biológica se consideran actualmente la única alternativa en el futuro a los polímeros derivados del petróleo, ya que los recursos fósiles se agotan. A pesar del potencial de los biopolímeros para sustituir materiales sintéticos para la reducción del impacto ambiental, éstos aún presentan varios inconvenientes en cuanto a sus propiedades físicas y deficiencias de procesamiento, que dificultan su uso en diversas aplicaciones, especialmente en el envasado de alimentos (Fortunati y col., 2018).

2.1. Películas a base de polisacáridos

Las películas de biocompuestos se basan en diferentes matrices y rellenos de biopolímeros y se pueden obtener mediante diversos métodos de procesamiento.

La celulosa es el biopolímero más abundante y se emplea ampliamente para materiales biocompuestos sostenibles debido a su carácter renovable, biodegradabilidad y otras propiedades específicas. Puede convertirse en diferentes estructuras con una variedad de propiedades físicas, según el origen de la celulosa y el método de producción (Senthil y col., 2018). Las microfibras de celulosa (CMF) se pueden obtener refinando suspensiones de celulosa diluidas a alta presión. La celulosa nanofibrilada (NFC) resulta de la desintegración de las fibras de celulosa utilizando homogeneizadores de alta presión combinados con tratamientos químicos o enzimáticos (Missoum, Belgacem, Materials, y 2013, 2013). Además, si

se eliminan las partes amorfas de la celulosa, dejando cristales únicos y bien definidos en una suspensión coloidal estable, se puede obtener celulosa microcristalina (MCC) (de Souza Lima y Borsali, 2004). Así, dependiendo de la estructura de la celulosa y las propiedades deseadas de los materiales finales, este polisacárido se puede utilizar como matriz biopolimérica o relleno biocompuesto.

Los materiales a base de almidón ofrecen una base muy atractiva de bajo costo para los nuevos polímeros biodegradables debido a su abundancia, renovabilidad anual y capacidad para ser procesados con equipos de procesamiento de plástico convencionales (Bodirlau, Teaca, y Spiridon, 2013; Liu y col., 2020; Sanyang, Ilyas, Sapuan, y Jumaidin, 2017). La mejora de las propiedades mecánicas de los materiales a base de almidón es un desafío continuo debido a su pobre desempeño mecánico, particularmente a la resistencia a la tracción (Nasseri y Mohammadi, 2014). Entre las alternativas para mejorar estas propiedades mecánicas, se han propuesto mezclas y compuestos (Ali y col., 2018; Bodirlau y col., 2013; Castillo y col., 2013; Stasi y col., 2020). Los plastificantes más utilizados para modificar las propiedades mecánicas son el glicerol, sorbitol y polietilenglicol, ya que disminuirían las interacciones intermoleculares entre las cadenas de polímeros adyacentes, aumentando de esta forma la flexibilidad de la película que es uno de los requisitos necesarios para utilizar estos materiales en el envasado de alimentos.

Además, las películas a base de almidón presentan la capacidad de termosellarse (López, Lecot, Zaritzky, y García, 2011) por las técnicas clásicas aplicables a los materiales sintéticos, característica más que relevante en el desarrollo de envases tipo bolsa.

2.2. Biomateriales en aplicaciones alimentarias

Los cambios en el estilo de vida han influido directamente en el tipo de alimentos que consumimos y los hábitos de consumo, lo que a su vez ha generado la necesidad de que la industria alimentaria desarrolle nuevos envases y embalajes. Tal es así, que hoy en día prácticamente cualquier producto alimenticio que consumimos se comercializa envasado, no sólo para contener el alimento sino también para protegerlo durante toda la cadena productiva, hasta llegar al punto de venta o

consumo. Los envases alimentarios cumplen funciones muy importantes para la conservación de alimentos, los protegen de agentes externos previniendo la contaminación física, química y/o microbiológica, así como también de su posible adulteración. De esta manera, cumplen la función de barrera contra el medioambiente que los rodea, protegiendo a los alimentos de la humedad y oxidación (Figura 3).

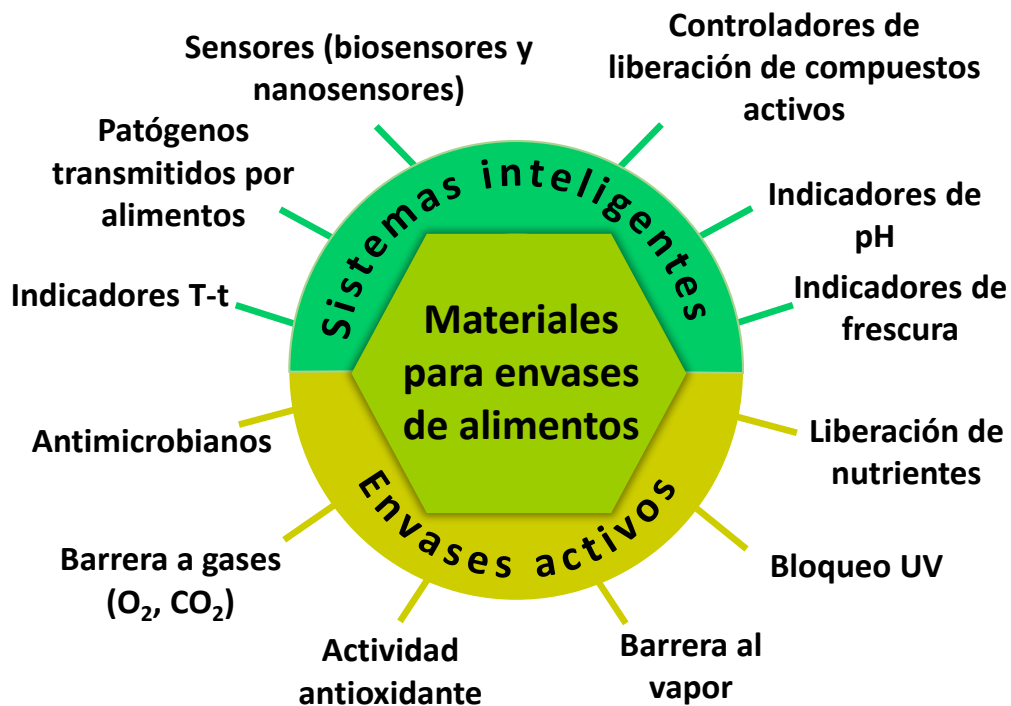


Figura 3: Clasificación y funciones de los materiales para envasado de alimentos.

Los envases activos (Figuras 2 y 3), habitualmente utilizados en el envasado de alimentos, son aquellos que contienen alguna sustancia capaz de conservar las características organolépticas o sensoriales de un producto para asegurar su calidad. Son de especial interés los envases activos que contienen antioxidantes naturales y antimicrobianos que no sólo prolongan la vida útil de los productos envasados al prevenir reacciones de rancidez, sino que también evitan el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos (Jafarzadeh y col., 2020). Los polímeros biodegradables y de base biológica son preferibles para el desarrollo

de materiales activos de un solo uso para envases de alimentos debido a su bajo impacto ambiental (Liang y col., 2019; Ortega y col., 2017; Passaretti y col., 2019; Youssef y El-Sayed, 2018). Algunos de los polímeros y compuestos naturales pueden obtenerse a partir de residuos industriales agroalimentarios y su utilización añadiría valor a estos residuos y los mantendría en circulación, una de las premisas de la economía circular. Un claro ejemplo es el uso del quitosano, un polímero biodegradable derivado de la quitina con actividad antimicrobiana que se obtiene de los desechos de la industria pesquera como los exoesqueletos de crustáceos (Dima, Sequeiros, y Zaritzky, 2017). Asimismo, los subproductos y desechos del procesamiento de frutas y hortalizas son una fuente importante de compuestos con alto valor nutricional y funcional, como vitaminas, minerales, antioxidantes y compuestos antimicrobianos, aunque a menudo se descartan o derivan para la alimentación animal (Varghese, Siengchin, y Parameswaranpillai, 2020). Los aceites esenciales (AE) que pueden obtenerse de estas fuentes han sido ampliamente estudiados como aditivos para el desarrollo de envases de alimentos activos, principalmente debido a su capacidad antioxidante y antimicrobiana y su carácter GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Atarés y Chiralt, 2016; Sharma, Barkauskaite, Jaiswal, y Jaiswal, 2021). Por tanto, el uso de compuestos activos derivados de subproductos agrícolas no solo contribuye a la recuperación de estos compuestos con actividades específicas, sino que también les genera un valor agregado. Por ejemplo, Bof, Jiménez, Locaso, García, y Chiralt, (2016) han desarrollado y caracterizado películas biodegradables activas basadas en almidón de maíz y quitosano con la adición de aceite esencial de limón (LEO) y extractos de semillas de pomelo (GSE). La inclusión de estos compuestos activos, que son subproductos o derivados de residuos del procesamiento de cítricos, no afectó las propiedades mecánicas del material y proporcionó capacidad antimicrobiana por contacto. De manera similar, Kanmani & Rhim (2014a) desarrollaron películas activas antimicrobianas con GSE en una matriz de carragenina, con una capacidad de barrera adicional a los rayos UV, particularmente importante para los envases de alimentos sensibles a los rayos UV.

2.3. Biopolímeros nanocompuestos

La utilización de polímeros biodegradables es limitada debido a problemas relacionados con el tratamiento, rendimiento (bajas propiedades de barrera a gases y humedad) y costos elevados. Mediante la aplicación de la nanotecnología se abren nuevas posibilidades para mejorar no sólo las propiedades del material sino también la relación costo-eficiencia (Elizondo y Gallo, 2011).

Un *nanobiocompuesto* es un material que consiste en una matriz biopolimérica reforzada con una fibra, platelets (plaquetas) o partículas que tienen al menos una dimensión en la escala nanométrica. Por la presencia de partículas de tamaño nanométrico dispersas en la matriz biopolimérica, estos *nanobiocompuestos* exhiben una notable mejora en las propiedades mecánicas, térmicas, ópticas y fisicoquímicas en comparación con el polímero puro o los convencionales. Esas mejoras incluyen, por ejemplo, el aumento de módulos de elasticidad, fuerza y resistencia al calor, y la disminución de la permeabilidad a los gases y a la inflamabilidad. Así, combinando nuevas tecnologías de procesamiento con la nanotecnología, se pueden desarrollar materiales sostenibles y empaques activos y bioactivos que aprovechan la interacción del envase con el alimento para la extensión de la vida útil o para mejorar las propiedades sensoriales del alimento, a la vez que mantiene la calidad del mismo (Elizondo y Gallo, 2011; Kuorwel, Cran, Orbell, Buddhadasa, y Bigger, 2015; López y col., 2011).

Los biocompuestos a base de almidón y nanoarcillas han sido los más estudiados (Abreu y col., 2015; Cheviron y col., 2014; Cheviron, Gouanvé, y Espuche, 2015, 2016), aunque se han utilizado otras matrices biopoliméricas, como quitosano (Rhim, Hong, Park, y Perry K. W. NG, 2006), agar (Rhim, Wang, y Hong, 2013; Rhim, Wang, Lee, y Hong, 2014), proteínas (Kanmani y Rhim, 2014a, 2014b) o su combinación (Yoksan y Chirachanchai, 2010; Zolfi, Khodaiyan, Mousavi, y Hashemi, 2014). Habitualmente, los materiales obtenidos presentaron menor hidrofiliidad y actividad bacteriostática frente a *S. aureus* y *E.coli*. Asimismo, Ortega y col. (2017) mostró que la incorporación de AgNPs en películas a base de almidón de maíz disminuyó la solubilidad del material y mejoró las propiedades mecánicas al

umentar el módulo de Young y los valores de esfuerzo sin disminuir la deformación a la ruptura. Malathi y Singh, (2019) han informado efectos similares mediante la incorporación de nanopartículas de TiO_2 a películas de almidón de arroz. En este caso, los autores demostraron que el material nanocompuesto presentaba una mejor barrera al vapor de agua, mejores propiedades mecánicas y actividad bacteriostática contra *E.coli*. La incorporación de nanopartículas de ZnO también ha demostrado ser una estrategia interesante para mejorar las propiedades y añadir actividad bactericida a las películas de almidón (Estevez-Areco, Guz, Famá, Candal, & Goyanes, 2019). Al respecto, Mirjalili y Yassini Ardekani, (2017) señalaron que las películas a base de almidón que contienen nanopartículas de ZnO tienen mejores propiedades mecánicas y actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*. Por otro lado, Nafchi, Nassiri, Sheibani, Ariffin, y Karim, (2013) indicaron que la incorporación de nanobarras de ZnO reduce la hidrofobicidad, mejora las propiedades mecánicas y proporciona actividad antimicrobiana contra *E. coli* a las películas de almidón de sagú, mientras que Guz, Famá, Candal, y Goyanes, (2017) señalaron que las propiedades de las películas de almidón que contienen nanobarras de ZnO dependen en gran medida de su tamaño.

En la Tabla 2 se resumen los diferentes tipos de nanopartículas incluidas en las formulaciones de nanocompuestos, siendo las AgNPs las más utilizadas para aplicaciones de envasado de alimentos, ya que refuerzan eficazmente las matrices biopoliméricas y les confieren capacidad antimicrobiana sobre un amplio espectro de bacterias, virus y hongos (Cano, Cháfer, Chiralt, & González-Martínez, 2016; Ortega, Arce, et al., 2021; Ortega et al., 2019, 2017). Aunque se han estudiado numerosos nanocompuestos o sistemas activos, la literatura disponible se refiere principalmente a materiales fabricados utilizando la metodología de evaporación de solventes, la cual es difícil de escalar. El desarrollo de materiales nanocompuestos biodegradables a través de tecnologías escalables es fundamental para la implementación industrial de dichos sistemas. En este contexto, la extrusión es un proceso continuo y escalable, sin embargo, se requiere el estudio del efecto de la extrusión sobre las nanopartículas o moléculas bioactivas. En este sentido, es necesario analizar la mezcla y distribución de los componentes dentro de la matriz,

las interacciones resultantes y su efecto sobre las propiedades del material, y la posible degradación de los aditivos durante el proceso de fabricación. En estudios recientes se han extruido con éxito biocompuestos de almidón termoplástico con nanopartículas (Campos-Requena y col., 2017; Estevez-Areco, Guz, Famá, Candal, y Goyanes, 2019).

Tabla 2: Propiedades relevantes de las películas nanocompuestas. Adaptada de Ortega, Versino, y col., 2021.

Biopolímero	Nanopartículas	Tecnología de procesamiento	Propiedades mecánicas	Permeabilidad al vapor de agua	Solubilidad (%)	Actividad antimicrobiana	Capacidad antioxidante
Almidón de mandioca	ZnO nanobarras (1%)	Casting	$\sigma_m^{(1)} = 2,8-3,2$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 50-58\%$	$4,7-5,3 \times 10^{-10}$ g/m s Pa	8-16	Inhibición del crecimiento de <i>E. Coli</i>	-
Almidón de maíz	Síntesis verde de AgNPs <i>in situ</i> (0-143ppm)	Casting	ME ⁽³⁾ = 36,9-166,8 MPa $\sigma_m^{(1)} = 161,6-368,1$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 38,1-39,7 \%$	$1,6-2,2 \times 10^{-10}$ g/m s Pa	29-34,4 (25°C) y 34,8-52,4 (100°C)	Concentraciones superior a 28,6 ppm, inhibición por contacto y. mayores a 71,5 ppm halo sobre <i>E. Coli</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>Penicillium</i> y <i>S. aureus</i> .	-
Almidón de maíz	AgNPs sintetizadas con jugo de limón (0-143ppm)	Casting	$\sigma_m^{(1)} = 2,1-4$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 41-55 \%$	0,63- $1,62 \times 10^{-10}$ g/m s Pa	34,6-46	Concentraciones superior a 28,6 ppm, inhibición por contacto y. mayores a 71,5 ppm halo sobre <i>E. Coli</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>Penicillium</i> y <i>S. aureus</i> .	-
Almidón de maíz termoplástico	Nanopartículas de quitina (0-9 %p/p)	Casting	$\sigma_m^{(1)} = 3,89-9,32$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 30-87 \%$	$7-12 \times 10^{-11}$ g/mhPa	-	Acción contra <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	-
Quitosano	Aceite esencial de romero (0,5-1,5%v/v) + nanoarcilla de montmorillonita (MMT) (1-5%p/p)	Casting	$\sigma_m^{(1)} = 63,7-83,0$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 3,0-4,3 \%$	0,31- $0,47 \times 10^{-10}$ g/m s Pa	9,5-15,0	Con 1,5% REO inhibición de <i>S. agalactiae</i> , <i>E Coli</i> y <i>L. monocytogenes</i>	1,4-2,2 mg ác. galico/g muestra

Quitosano	AgNPs polifenoles de té (0,1%)	Casting	$\sigma_m^{(1)} = 32,8-53,7$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 25,9-12,6$ %	$39,0-16,7 \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$	-	Films mostraron actividad antimicrobiana sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Las películas con TP-AgNP tienen una capacidad antioxidante mejorada
Quitosano y almidón de arroz	AgNPs (0-38 ppm)	Casting	$\sigma_m^{(1)} = 66,8-74,5$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 4,6-7,6$ %	WVTR 47,60-59,21 g $\text{m}^{-2} \text{ day}^{-1}$		Inhibición de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>B. cereus</i>	-
PLA	Nanopartículas de zeolita de intercambio iónico con sal de cobre (1-3% p/p) + nanocelulosa (1,5-2% p/p)	Electrospinning dual	ME ⁽³⁾ = 602-807,9 MPa $\sigma_m^{(1)} = 2,3-3,3$ MPa $\epsilon_B^{(2)} = 4,1-13,1$ %	5,73- 5,87 x 10 ⁻¹⁵ g/m s Pa		Inhibición de <i>S. aureus</i> y <i>S. Typhi</i>	-

⁽¹⁾ Máxima resistencia a la tracción (σ_m); ⁽²⁾ Elongación a la ruptura (ϵ_B); ⁽³⁾ Módulo elástico (ME)

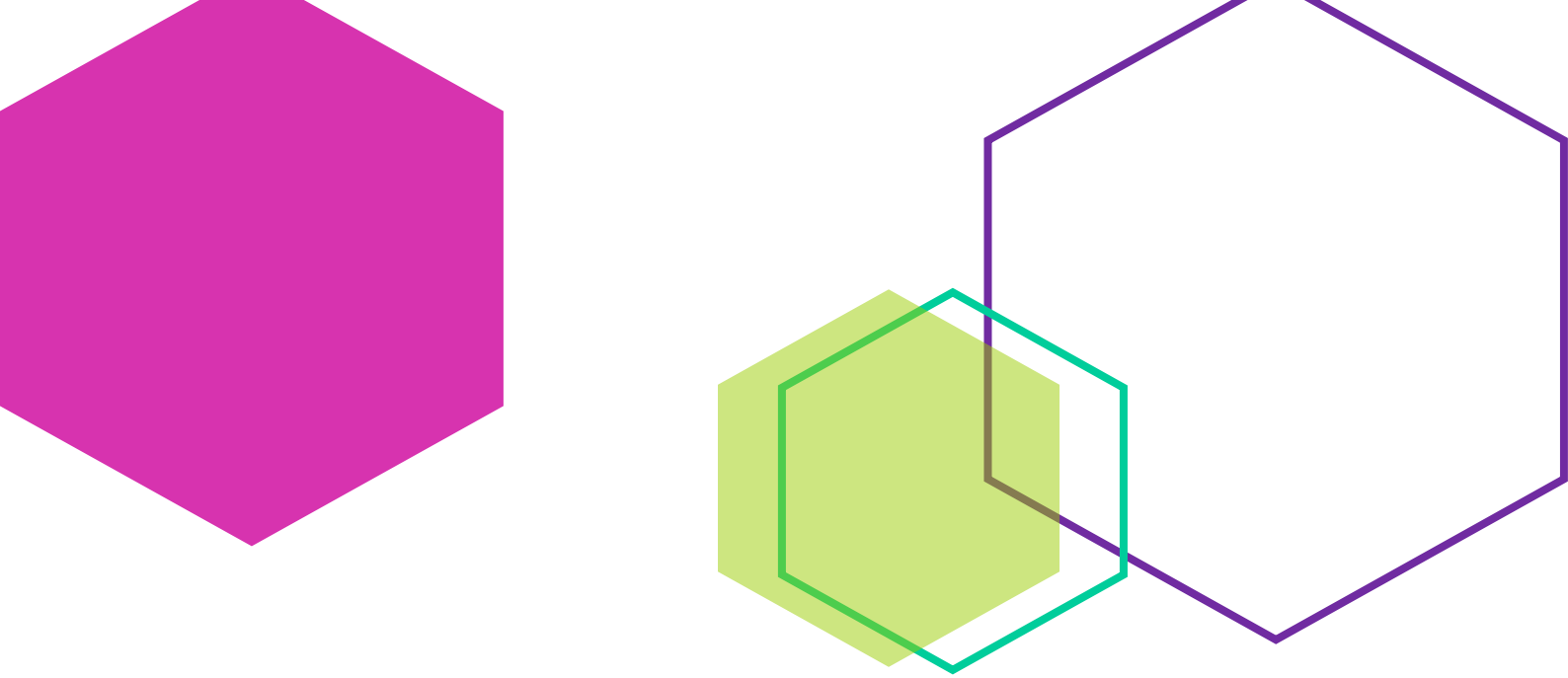
En materiales activos y nanocompuestos, el estudio de la microestructura permite la interrelación de la estructura de la matriz con las propiedades que determinan el desempeño del material, además de poder inferir la efectividad de la inclusión del relleno. En general, cuando se visualizan mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) superficies homogéneas sin poros ni grietas así como secciones transversales compactas, los compuestos activos o nanopartículas incluidos son compatibles con la matriz polimérica, lo que también conduce a su refuerzo. Estas observaciones concuerdan con el comportamiento mecánico informado de los materiales nano-reforzados (Guz y col., 2017; Ortega y col., 2017; Yoksan y Chirachanchai, 2010). En consecuencia, la compatibilidad del agente activo con la matriz determina la eficacia con la que el primero se incorpora a la red polimérica y, por tanto, las características de la microestructura de la película. En este sentido, la espectroscopia ATR-FTIR es una técnica útil que se ha empleado ampliamente para estudiar la interacción entre los constituyentes compuestos.

Objetivos generales

El **objetivo general del trabajo de Tesis** fue: desarrollar películas activas a base de almidón con agregado de nanopartículas de plata (AgNP) obtenidas a partir de distintas técnicas de síntesis verde con el fin de obtener envases con capacidad antimicrobiana aptos para alimentos.

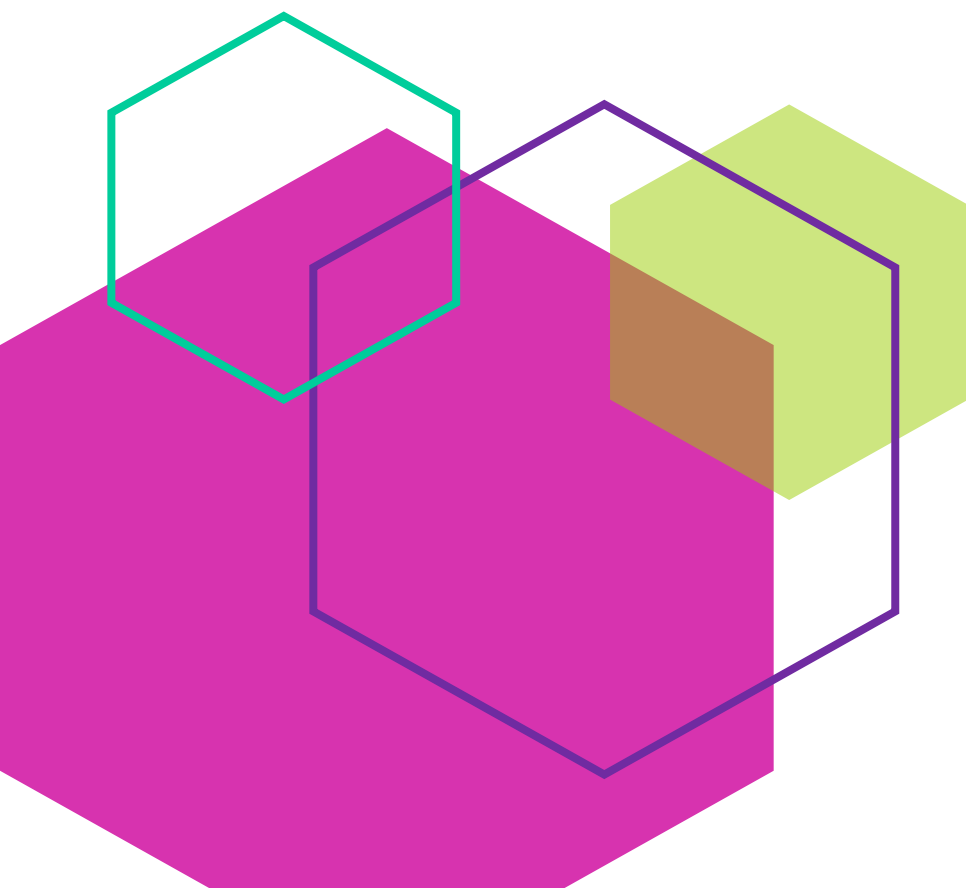
A tal fin se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Sintetizar y caracterizar AgNPs mediante métodos químicos y físicos.
2. Desarrollar películas biodegradables a partir de almidón de maíz con el agregado de las AgNPs sintetizadas.
3. Caracterizar las películas nanocompuestas obtenidas evaluando sus propiedades fisicoquímicas, de barrera, mecánicas y ópticas.
4. Estudiar la microestructura de los materiales nanocompuestos evaluando las interacciones entre los componentes a fin de interpretar los cambios observados en las propiedades relevantes que condicionan el uso de los nanomateriales.
5. Evaluar la capacidad antimicrobiana de los materiales activos desarrollados, la migración de las AgNP a diferentes medios simulantes, la citotoxicidad de los mismos y su biodegradación en condiciones de compostaje.
6. Proponer posibles aplicaciones alimentarias para las películas nanocompuestas desarrolladas.



CAPÍTULO 1

Películas nanocompuestas con síntesis de nanopartículas de plata *in situ* (AgNPs)



1. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de plata son sintetizadas mediante una gran variedad de técnicas, sin embargo, la reducción química de la sal del metal, dentro de los procesos *bottom up*, ha sido uno de los métodos más estudiados (Kulkarni, 2015). Entre los reactivos utilizados generalmente se encuentran varios reductores, orgánicos e inorgánicos por ejemplo, etilenglicol, NaBH_4 , citrato trisódico, hidrato de hidracina (Guzman, Dille, y Godet, 2012; Morales, Morán, Quintana, y Estrada, 2009; Pinto y col., 2010), que suelen ser tóxicos o generan subproductos que no son amigables con el medio ambiente. Lo mismo ocurre con los agentes estabilizantes o de *capping*, que pueden ser moléculas orgánicas simples, polímeros sintéticos, entre otros. Estos agentes son de suma importancia para la síntesis de NPs, ya que fijan el tamaño de las mismas mediante una estabilización electrostática (generando carga en la superficie de la nanopartícula) o por un mecanismo estérico (anclando largas cadenas hidrocarbonadas sobre la superficie de la nanopartícula) (Pradeep y Anshup, 2009). Como alternativa al uso de reactivos químicos tóxicos, desde hace algunos años la ciencia se ha enfocado en el desarrollo de técnicas de síntesis “verdes”, las cuales pueden llegar a ser igualmente rentables a la hora de pensar en una producción a gran escala de NPs. Es así que, la “química verde” se ha transformado en una filosofía que se esfuerza en reducir al mínimo posible el impacto ambiental mediante procesos “limpios”, evitando el uso indiscriminado de materias primas no renovables, así como el empleo de productos químicos peligrosos o contaminantes (Afanador y Pimiento, 2007).

Los tres conceptos principales para la obtención de nanopartículas mediante “síntesis verde” son: la elección del solvente (preferentemente agua), un agente reductor ecológico, reactivos considerados como GRAS (sustancias generalmente reconocidas como seguras) o de origen natural; y un material no tóxico para la estabilización de las nanopartículas (por ejemplo, biopolímeros). Los productos de origen natural, contienen en su estructura compuestos fenólicos, azúcares reductores, compuestos nitrogenados, entre otros, que tienen la capacidad de reducir los cationes metálicos para generar las nanopartículas, y en ciertos casos también pueden actuar como estabilizantes. A su vez, la implementación de estos compuestos también es ventajosa desde el punto de vista

económico, ya que pueden provenir de desechos o subproductos agroindustriales, no requieren altas temperaturas, y por ende gran consumo de energía.

Teniendo en cuenta esto, en este Capítulo se propuso un método simple y no tóxico para la obtención de nanopartículas de plata en donde la maltosa se utilizó como agente reductor, el almidón de maíz como estabilizante y el agua ultrapura como solvente.

En este contexto, plantear el uso de almidón de maíz como estabilizante permite acoplar la síntesis de las AgNPs a la preparación de la suspensión filmogénica y así obtener las películas nanocompuestas en pocos pasos, optimizando tanto el tiempo de elaboración, como el consumo de reactivos y energía. A este proceso lo denominaremos en este trabajo de Tesis síntesis de AgNPs *in situ*.

Sin embargo, el hecho de acoplar ambos procesos requiere una puesta a punto previa de las concentraciones de reactivos y condiciones de reacción para la obtención de las AgNPs en la suspensión filmogénica. Asimismo, una vez optimizadas las condiciones de la síntesis de nanopartículas *in situ*, resulta relevante profundizar los estudios relacionados con el efecto del contenido de almidón en el desarrollo de las películas nanocompuestas.

2. OBJETIVOS

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata *in situ* estabilizadas en la suspensión filmogénica de almidón de maíz nativo.
- Obtener materiales nanocompuestos a partir de las suspensiones filmogénicas que incluyen las AgNPs y caracterizar los mismos evaluando las propiedades relevantes que condicionan su posterior uso.
- Estudiar el efecto de la síntesis de AgNPs *in situ* sobre matrices con diferentes concentraciones de almidón.
- Evaluar la aplicación de los materiales nanocompuestos desarrollados como envases para alimentos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de las nanopartículas, materiales nanocompuestos y los ensayos mencionados, se utilizaron reactivos de grado analítico, y las soluciones de los reactivos mencionados fueron preparadas con agua ultrapura con una resistencia específica de 18 MΩ.

3.1. Síntesis y caracterización de las AgNPs *in situ*

Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) a partir de la reducción química de una solución de AgNO₃ empleando maltosa como agente reductor, y almidón de maíz como agente estabilizante y medio dispersante. Los sistemas nanocompuestos se obtuvieron siguiendo el protocolo propuesto por Oluwafemi y col. (2013) realizando algunas modificaciones. A fin de optimizar la síntesis de AgNPs *in situ* se realizaron ensayos preliminares los que permitieron seleccionar las concentraciones de los reactivos involucrados así como las condiciones del proceso (tiempo - temperatura). Las nanopartículas se sintetizaron a partir de una suspensión de almidón de papa soluble al 1 % p/v (Anedra, CAS [9005-84-9]), AgNO₃ 1M (AgNO₃ p.a. Biopack, CAS [7761-88-8]) y se probaron dos concentraciones de maltosa (Biopack, CAS [6363-53-7]) como agente reductor (1M y 2M). Se procedió de la siguiente manera: se disolvió el almidón en agua ultrapura con agitación constante, y a continuación se incorporaron 5 mL de AgNO₃ y 10 mL de maltosa. El sistema se agitó continuamente a 75 °C durante 180 min extrayéndose alícuotas a diferentes tiempos. Éstas fueron almacenadas al resguardo de la luz en frascos color ámbar a temperatura ambiente y luego se realizó un seguimiento espectrofotométrico para observar el plasmón característico que indica la presencia de AgNPs.

Dado que el almidón soluble no posee capacidad filmogénica, para la obtención de los films nanocompuestos en una segunda etapa y con el fin de acoplar ambos procesos se utilizó almidón de maíz nativo (Maizena®, Unilever, Argentina), se realizó la síntesis de AgNPs a partir de AgNO₃ y maltosa (ambas 1M), evaluándose la concentración de almidón de maíz al 3 % (p/v). En primer lugar, se gelatinizó el almidón a 90 °C durante 20 min, y a continuación se agregaron 10 mL de maltosa y 5 mL de AgNO₃ y se mantuvo

en agitación constante durante 60 min. Se tomaron muestras a diferentes tiempos del ensayo con el fin de observar la formación y estabilidad de las nanopartículas.

En base a ensayos preliminares, se encontró que las mejores condiciones de gelatinización para la suspensión de almidón de maíz son 20 min a 90 °C con agitación continua.

Por otra parte, varios estudios han demostrado los efectos citotóxicos de las nanopartículas de plata sobre fibroblastos y osteoblastos (AshaRani, Mun, Hande, y Valiyaveetil, 2009; Flores y col., 2013; Hackenberg y col., 2011; Marambio-Jones, Catalina Hoek, 2010)). Conforme a estos estudios, las concentraciones de AgNPs de hasta 75 μM se encontrarían dentro de los límites de seguridad citotóxica. Asimismo, Ghosh y col. (2010) informaron que las AgNPs exhibían un bajo nivel de toxicidad en cantidades de 72 mg/L, observando una drástica reducción de la viabilidad celular a concentraciones mayores. Debido a esto, se decidió realizar la síntesis de las nanopartículas utilizando concentraciones de AgNO_3 y maltosa del orden micromolar (μM) y por debajo de éstos límites de seguridad mencionados.

Se preparó una solución stock de AgNO_3 $6,5 \cdot 10^{-4}$ M de forma tal de tener una concentración de Ag en la suspensión filmogénica de 50 μM (143 ppm en la película una vez obtenida). Para asegurar el efecto reductor de la maltosa se definió su concentración como dos veces la concentración del stock de Ag ($1,3 \cdot 10^{-3}\text{M}$). En primer lugar, se gelatinizó la suspensión de almidón de maíz al 3 % p/v a 90 °C durante 20 min, a continuación se incorporaron 10 mL de la solución de maltosa y 5 mL de AgNO_3 manteniéndose la agitación durante 60 min. Al igual que en los casos anteriores, se tomaron alícuotas a distintos tiempos para seguir la formación de las AgNPs y estudiar su estabilidad. Espectrofotométricamente no pudieron observarse las AgNPs ya que la concentración de plata fue muy baja.

Debido a que la concentración de plata utilizada para la síntesis de las nanopartículas es muy baja y a los inconvenientes derivados de la turbidez de la matriz, tuvo que modificarse la suspensión nanocompuesta para su adecuada caracterización, ya que, la mayoría de las técnicas utilizadas no permitían su visualización. Solamente con el fin de caracterizar las AgNPs, se preparó una suspensión siguiendo el protocolo antes

descripto reemplazando la suspensión de almidón nativo, por soluble, y la solución de AgNO_3 $6,510^{-4}$ M, por una de concentración 1000 μM . Las muestras se guardaron en frascos color ámbar a temperatura ambiente para su posterior caracterización.

3.2. Caracterización de la suspensión nanocompuesta

El estudio de esta suspensión está orientado a conocer parámetros que pueden afectar la estabilidad de las NPs y su comportamiento como agente antimicrobiano. Entre ellos se pueden mencionar la morfología, el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial Z.

3.2.1. Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta y visible (UV-vis)

La espectroscopia de absorción UV-vis es una técnica ampliamente utilizada para el análisis químico de diferentes muestras. Las medidas realizadas en el rango de longitud de onda (λ) entre el visible y el ultravioleta permiten obtener información tanto cuali como cuantitativa de una gran variedad de especies orgánicas e inorgánicas, lo cual es de mucha utilidad a la hora de caracterizar diferentes materiales. Esta técnica permite estudiar la efectividad de los métodos de síntesis de las AgNPs ya que estas presentan un plasmón de resonancia superficial (SPR por su sigla en inglés *surface plasmon resonance*) característico cuyo máximo se encuentra en el rango de 400 - 450 nm.

En el presente trabajo de Tesis se utilizó un espectrofotómetro T90+UV/vis Spectrometer (PG Instruments, EE. UU.). A las muestras obtenidas de los diferentes tiempos de síntesis, debido a su turbidez, se les realizó una dilución 1:5 en agua ultra pura y se colocaron en cubetas de cuarzo con un camino óptico de 1 cm para seguir la cinética de formación de AgNPs, obteniendo los espectros de las muestras en el rango de longitudes de onda de 200 a 700 nm. Se utilizó una suspensión de almidón tratada de igual forma que la muestra como referencia. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

3.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica, conocida como TEM (por su sigla en inglés *transmission electron microscopy*), ha sido fundamental para el desarrollo de la ciencia ya que, permite resolver detalles de las estructuras de muestras tanto biológicas o no a escalas

micrométricas y nanométricas. En estos microscopios, muestras muy delgadas (con espesores de 50 Å o menores) son atravesadas por un haz de electrones que pasa por un sistema de lentes electromagnéticas donde una parte de éstos rebotan o son absorbidos por la muestra, y otros la atraviesan formando una imagen aumentada de la misma. La imagen que se genera puede ser visualizada con altas magnificaciones y alcanzando, en ciertos casos, altas resoluciones. Además, esta capacidad se puede mejorar con sistemas analíticos capaces de brindar información precisa sobre la composición y estructura de la muestra, así como también adaptarse a bajas temperaturas (*crio-TEM*) para muestras que pueden dañarse con el tratamiento convencional, pudiéndose combinar con un equipo de barrido (*scanning transmission electron microscopy, STEM*).

Esta técnica permitió estudiar las características morfológicas de las NPs sintetizadas.



Figura 1.1: Esquema de funcionamiento de un microscopio electrónico de transmisión (adaptado de la página www.microscopioelectronico.top) y fotografía del equipo JEM 1200EX II, Jeol (Jeol, Tokio, Japón).

Las imágenes de TEM presentadas en este trabajo de Tesis, fueron tomadas por dos microscopios. Por un lado, se utilizó un equipo JEM 1200EX II, Jeol (Jeol, Tokio, Japón) operando a una potencia de 80 kV y, equipado con una cámara Erlangshen ES1000W modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, EE. UU.) perteneciente al Centro de Microscopía Electrónica de la FCV-UNLP (Figura 1.1); y el otro equipo utilizado fue un HR-TEM TALOS F200X S/TEM (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), equipado con una

sonda para detección de señales de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS), el cual permite obtener, además del tamaño y morfología de las nanopartículas, una caracterización química en 3D mediante un mapeo composicional de la muestra. Este equipo pertenece a Y-TEC (YPF Tecnología).

Las observaciones se llevaron a cabo colocando gotas de las muestras en rejillas o grillas de C, sin tratamiento previo, las que luego se dejaron secar durante aproximadamente 10 minutos. Las micrografías de TEM fueron procesadas utilizando el software ImageJ Software™ (Schneider, Rasband, y Eliceiri, 2012a), a partir del cual se determinaron los tamaños (diámetro medio) de las AgNPs y su polidispersidad.

La polidispersidad se obtuvo a partir del tamaño y la desviación estándar calculada para la distribución de tamaños, y se define como el cociente entre la desviación y el tamaño medio obtenido para las nanopartículas (Okada y Kokhanovsky, 2009). La polidispersidad brinda una idea sobre la distribución global de tamaños de las NPs sintetizadas, asumiendo una sola media.

3.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de un microscopio electrónico se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Estas interacciones pueden proporcionar información sobre topografía, composición y estructura cristalográfica.

Los microscopios electrónicos de barrido constan de un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de 10^{-5} mm de Hg, en la cual se genera un haz de electrones de alta energía (5 - 30 kV). Este haz es colimado por una serie de lentes electrónicas y focalizado sobre la muestra analizada. Los detectores registran las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, que son procesadas y visualizadas en el monitor de la computadora asociada al equipo. A diferencia de una imagen óptica, el microscopio electrónico de barrido no forma una imagen real del objeto, sino que construye una imagen virtual a partir de alguna de las señales emitidas por la muestra.

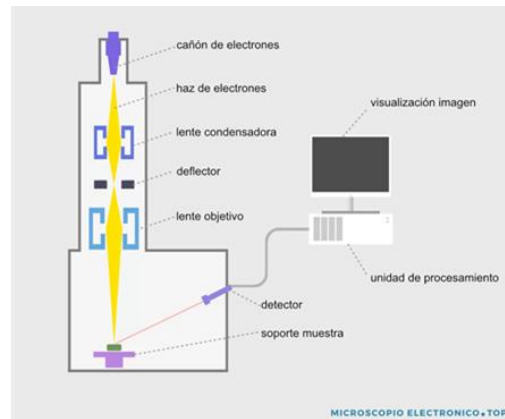


Figura 1.2: Esquema de funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (adaptado de la página: www.microscopioelectronico.top) y fotografía del equipo utilizado.

La caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas se complementó con imágenes obtenidas en el Centro de Microscopía Avanzada (Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA) con un SEM Zeiss Supra™ 40 (Alemania) el cual cuenta con un cañón de electrones por emisión de campo, una columna GEMINI® de tercera generación y un detector In-Lens (Figura 1.2). El voltaje de aceleración utilizado fue de 3,00 kV.

Las observaciones se llevaron a cabo colocando gotas de las muestras sobre cintas bifaz de carbono colocadas sobre tacos de bronce, las que luego se dejaron secar. Las micrografías de SEM fueron procesadas utilizando el software ImageJ Software™ (Schneider, Rasband, y Eliceiri, 2012), a partir del cual se determinaron los tamaños (diámetro medio) de las AgNPs y su polidispersidad, como se describió previamente.

3.2.4. Potencial Z

Como se puede observar en la Figura 1.3, la superficie de las partículas en solución se encuentra cargada eléctricamente y esto influye en la distribución de los iones circundantes en la interfase, resultando en un aumento de la concentración de iones con carga opuesta (contra-iones). De esta forma, cada partícula en solución se encuentra rodeada por contra-iones, generando una capa rígida conocida como *capa de Stern*; seguida por una *capa difusa* donde los iones con carga opuesta son todavía atraídos por la partícula inicial, pero rechazados por la capa de Stern y otros iones. Los contra-iones tienen una concentración alta cerca de la superficie, la cual va disminuyendo gradualmente hasta que se equilibra con la concentración de contraiones en el seno de

la solución. De esta manera, crean una doble capa eléctrica en la interfase partícula-líquido cuyo espesor depende del tipo y concentración de los iones en solución, así como también del pH y la fuerza iónica de la misma (Bhattacharjee, 2016).

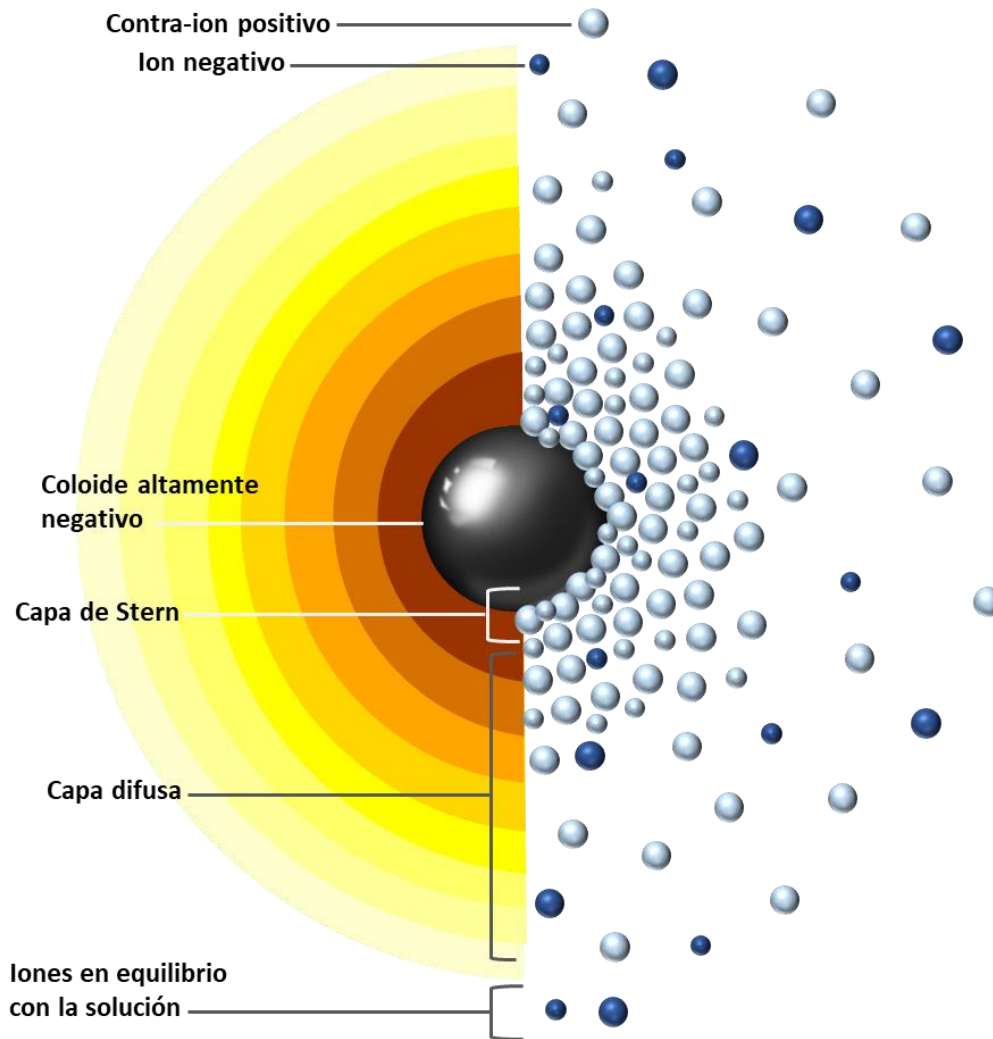


Figura 1.3: Formas de visualizar la doble capa. El lado izquierdo muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide, mientras que el derecho, la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado. Esquema adaptado de Zeta-meter Inc. (2008).

La nanopartícula y su atmósfera cargada generan un potencial eléctrico relativo a la solución, el cual tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia desde la NP hacia el seno de la solución, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. Esta caída del potencial determina a qué distancia entran en juego las fuerzas repulsivas entre las nanopartículas. Un punto importante es el potencial donde

se unen la *capa difusa* y la de *Stern*, el cual es conocido como *potencial zeta* (*potencial Z, ζ*). Este parámetro es importante ya que puede medirse fácilmente, mientras que la carga superficial de una partícula y su potencial no pueden determinarse (Bhattacharjee, 2016). En presencia de agua, existe una gran doble capa que permite que este potencial sea una buena aproximación del potencial superficial de la partícula.

El potencial Z es útil para seguir el comportamiento de un sistema coloidal nanocompuesto ya que, muestra los cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre partículas adyacentes de carga similar en la dispersión; lo cual permite realizar predicciones sobre la estabilidad de los sistemas coloidales.

Los valores pequeños de potencial Z indican que las fuerzas atractivas pueden exceder a las fuerzas de repulsión, haciendo que la dispersión se desestabilice. En cambio, si las partículas en suspensión tienen un potencial zeta más alto, negativo o positivo, van a tender a repelerse de modo que no se produzca floculación. Generalmente se consideran estables las suspensiones con valores de potencial $Z \pm 30$ mV (Haider y Mehdi, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el potencial Z no puede medirse directamente, sino que se deduce de modelos teóricos que se aplican a las medidas de la movilidad electroforética de las soluciones. En la práctica, se aplica un campo eléctrico a la dispersión, y las partículas cargadas migran hacia el electrodo con carga opuesta (electroforesis). Una de las formas de determinar la movilidad electroforética de las partículas, es mediante la dispersión de la luz electroforética (ELS, de sus siglas en inglés *Electrophoretic light scattering*). Durante la electroforesis, las partículas en movimiento dispersan la luz de un láser incidente cuya frecuencia es diferente a la del láser original y el cambio de frecuencia es proporcional a la velocidad de las partículas (Figura 1.4) (Kaszuba, Corbett, Watson, y Jones, 2010).

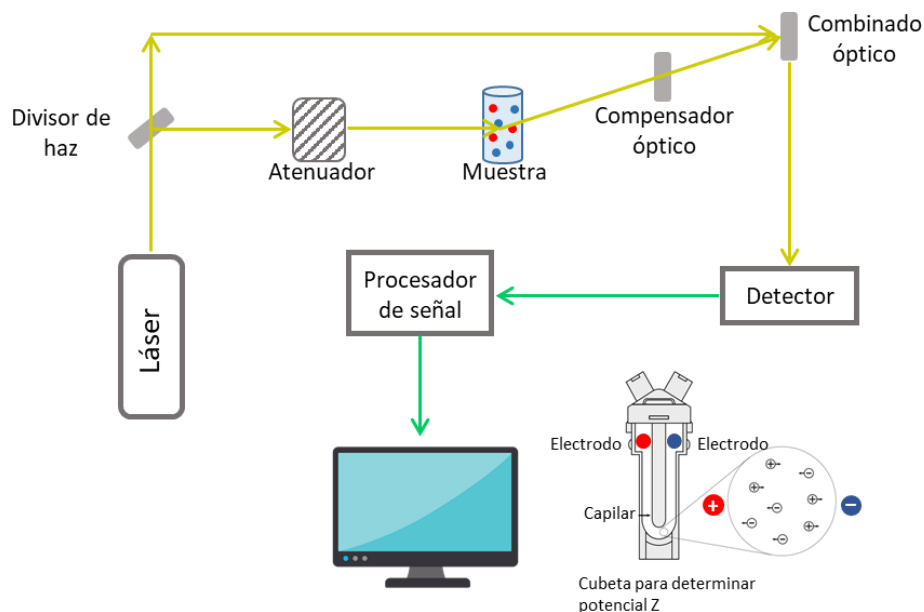


Figura 1.4: Esquema de funcionamiento de un equipo de potencial zeta.

El potencial Z de las suspensiones conteniendo las AgNPs sintetizadas se midió utilizando un equipo SZ-100 Nanopartica (Horiba Scientific, Japón) aplicando un voltaje de 3,3 V a 25 °C y con un ángulo de detección de 90°. Las muestras fueron diluidas (1:2) utilizando una solución de KNO_3 10^{-3}M como electrolito soporte (a fin de ajustar la fuerza iónica), y sonicadas durante 15 min antes de la determinación. La determinación se realizó al menos por duplicado.

3.3. Desarrollo de las películas nanocompuestas

Una vez que se caracterizaron las nanopartículas de plata se continuó con el desarrollo de los materiales nanocompuestos en donde la síntesis de las AgNPs se llevó a cabo *in situ* en las suspensiones filmogénicas.

En primer lugar, se prepararon suspensiones acuosas de almidón de maíz comercial (Maizena®, Unilever, Argentina) al 3 % p/v (3 g de almidón/100 mL). Según Liu y Han, (2005) esta sería una concentración crítica para la obtención de películas con este tipo de almidón mediante la técnica de moldeo y deshidratación (*casting*), ya que, a concentraciones menores la gelación de las suspensiones de almidón gelatinizadas se dificulta y con ello la formación de una matriz cohesiva y continua en los films durante

la etapa de secado. Las suspensiones filmogénicas fueron gelatinizadas durante 20 min a 90 °C en un baño termostático y con agitación constante.

Según el protocolo descrito en Ortega y col. (2017), a las suspensiones filmogénicas gelatinizadas se les incorporó un volumen tal de AgNO_3 $6,5 \cdot 10^{-4}$ M (Biopack, Argentina) a fin de tener una concentración final de plata en las películas de 5; 10; 25 y 50 μM (equivalente a 14,3; 28,6; 71,5 y 143 ppm en las películas nanocompuestas respectivamente). Seguidamente se agregaron 20 mL de una solución de maltosa $1,3 \cdot 10^{-3}$ M (Biopack, Argentina); esta concentración al estar en exceso con respecto a la concentración de plata asegura el efecto reductor del disacárido. La concentración de maltosa se mantuvo constante en todos los ensayos. A continuación, el sistema permaneció en agitación constante durante otros 20 min a 90 °C para lograr la síntesis de las AgNPs. Finalmente, las suspensiones gelatinizadas se dejaron enfriar hasta 50 °C y se les incorporó glicerol (Anedra, Argentina) como plastificante en una concentración del 30 % p/p respecto a la masa de almidón en la suspensión filmogénica. La concentración utilizada de plastificante fue optimizada previamente por López, Giannuzzi, Zaritzky, y García (2013). Un esquema del procedimiento se muestra en la Figura 1.5.

De modo similar se obtuvieron las muestras control (sin AgNPs), reemplazando las soluciones de AgNO_3 por el volumen equivalente de agua ultrapura, simulando todo el proceso.

Los films se obtuvieron mediante la técnica de *casting* para lo cual se pesaron 20 g de suspensión filmogénica en placas de Petri de 9 cm de diámetro con el fin de obtener una relación de moldeo (masa de suspensión filmogénica: área de placa) constante de $0,3141 \text{ g/cm}^2$. A continuación, las muestras se secaron a 50 °C en estufa hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 5 h). Los films fueron removidos de las placas y se acondicionaron a 25 °C y 70 % de humedad relativa (HR) por 4 días antes de realizar la caracterización de los materiales.

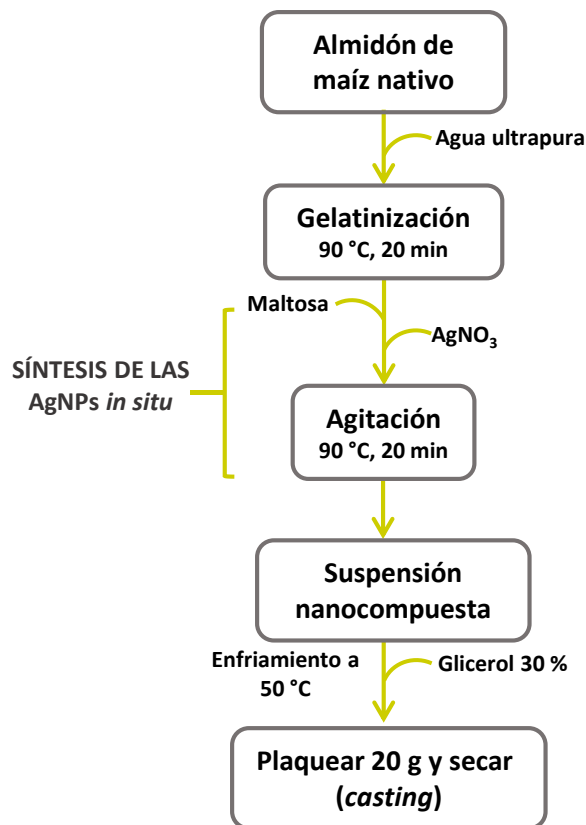


Figura 1.5: Diagrama del proceso de obtención de las películas nanocompuestas.

3.4. Técnicas de caracterización aplicadas a los materiales desarrollados

3.4.1. Espesor de las películas

El espesor de las películas se determinó utilizando un medidor electrónico, Digital Ultrasonic Thickness Gauge Meter CM-8822 (Nueva York, E.E.U.U.), sobre una base no ferrosa. Se realizaron 15 medidas de manera aleatoria sobre la superficie de cada muestra y los resultados informados corresponden al promedio de los valores obtenidos, indicándose además las desviaciones estándar.

3.4.2. Propiedades ópticas: color, capacidad de barrera al UV-vis, opacidad y/o transparencia

Las características ópticas de las películas y envases utilizados en alimentos como brillo, opacidad, color y transparencia condicionan la aceptación de los productos envasados por parte de los consumidores. Así, la determinación de las propiedades ópticas de los materiales obtenidos resulta más que relevante.

3.4.2.1. Color

El modelo cromático CIE $L^*a^*b^*$ (CIELab) se utiliza para describir los colores que el ojo humano puede percibir. Los tres parámetros que utiliza el modelo son la luminosidad L^* , y los parámetros de cromaticidad a^* y b^* . La luminosidad, varía entre 0 para el negro mate, y 100 para el blanco. Los valores de a^* negativos representan color verde, mientras que los positivos, rojo. El parámetro b^* indica color azul cuando toma valores negativos, y amarillo para valores positivos (Figura 1.6).

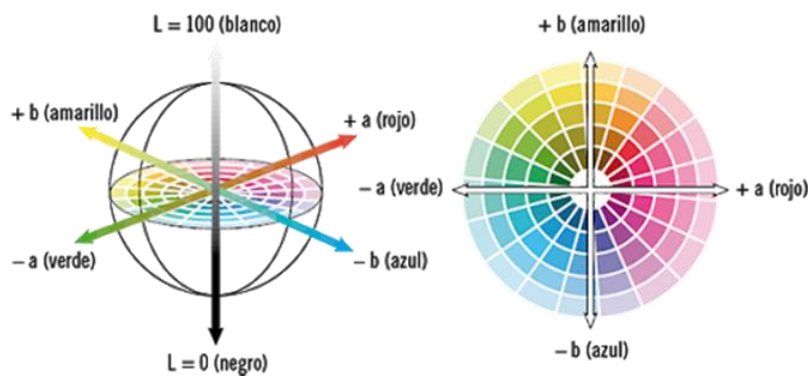


Figura 1.6: Parámetros de color superficial: luminosidad (L^*) y de cromaticidad a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul).

Las medidas de color superficial se realizaron utilizando un colorímetro Minolta CR Serie 300 (Tokio, Japón), calibrado con una placa estándar ($L^* = 97,54$, $a^* = -0,03$, $b^* = 1,74$). Las películas se colocaron sobre la placa estándar y se efectuaron cinco medidas al azar sobre cada muestra. A partir de los datos obtenidos se pudieron determinar los parámetros C^* (chroma) y Hue (tonalidad):

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad [1.1]$$

$$H^\circ = \text{arc tan} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad [1.2]$$

Asimismo, se calcularon las diferencias de luminosidad (ΔL) y de los parámetros de cromaticidad (Δa y Δb), teniendo en cuenta los datos del estándar utilizado para determinar la diferencia de color (ΔE) mediante la expresión:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad [1.3]$$

Los resultados informados en este trabajo de Tesis corresponden a los valores promedio obtenidos, mostrándose además la desviación estándar.

3.4.2.2. Capacidad de barrera UV, opacidad y transparencia

Para la determinación de la capacidad de barrera a la radiación UV, opacidad y transparencia tanto de las películas control como de las nanocompuestas, se cortaron muestras de 1 cm de ancho por 3 cm de largo, se colocaron en una celda de cuarzo y se registró el espectro de absorbancia entre 200 - 700 nm utilizando un espectrofotómetro T90+UV/vis Spectrometer (PG Instruments, EE.UU.).

La capacidad de barrera al UV se calculó como el área de integración bajo la curva del espectro registrado entre 200 y 400 nm y fue expresada como unidades de absorbancia por nanómetro (AU x nm).

En forma análoga, se determinó la opacidad de las películas como el área de integración bajo la curva registrada entre 400 y 700 nm y se expresó en unidades de absorbancia por nanómetros (AU x nm) según lo descrito por Gontard, Guilbert, y Cuq (1992). Esta técnica sigue las recomendaciones del método estándar para la determinación de turbidez y transmitancia luminosa de plásticos transparentes ASTM D 1003-00. Mientras que la transparencia se calculó como la absorbancia medida a 600 nm dividido por el espesor de la película expresado en mm, según Zhang y Han (2006).

Las muestras se analizaron al menos por triplicado y los resultados corresponden al promedio de los valores obtenidos, indicándose además las desviaciones estándar.

3.4.3. Permeabilidad al vapor de agua

Una de las propiedades más importantes al momento de desarrollar un material para el envasado de alimentos es la permeabilidad al vapor de agua (WVP por su sigla en inglés *water vapor permeability*) además de a los gases.

El vapor de agua es uno de los principales permeantes estudiados en alimentos, ya que puede transferirse del medio interno o externo a través del envase, provocando cambios en la calidad del producto lo que condiciona su vida útil.

Algunos autores (Cagri, Ustunol, y Ryser, 2004; Su y col., 2010), coinciden en que la WVP, es una medida de la facilidad con la que el vapor de agua puede atravesar un material. Este proceso puede darse por dos mecanismos; por un lado por capilaridad, el cual implica que puede haber alguna imperfección en la película (como por ejemplo gran porosidad) y el proceso de permeabilidad por difusión que incluye:

- Adsorción de las moléculas permeantes desde/entre la atmósfera interna/externa;
- difusión de las moléculas permeadas a través de la película;
- y finalmente pasaje al otro lado de la película.

El segundo paso del proceso, la difusión, depende del tamaño, forma y polaridad del permeante, cristalinidad del material y sus características microestructurales.

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua se utilizó el método gravimétrico ASTM E96 (2000) con algunas modificaciones. Las muestras a analizar se colocaron en celdas acrílicas de permeación que cuentan con una abertura circular de área conocida, y en su interior contienen sílica gel (0 % HR) como se muestra en la Figura 1.7. Seguidamente se pesaron las celdas en una balanza analítica y se colocaron en un recipiente hermético equilibrado a 75 % HR con una solución saturada de NaCl. El recipiente conteniendo las celdas se mantuvo en una cámara a 20 °C.

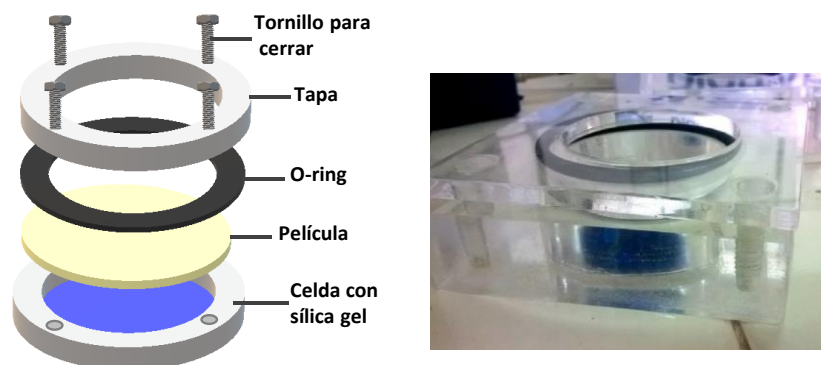


Figura 1.7: Celda de permeación modelo y fotografía de la utilizada en el ensayo.

La diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados de la película proporciona la fuerza impulsora para el flujo de vapor. A intervalos regulares de tiempo se pesaron las celdas y se calcularon los cambios de peso de las mismas; estos cambios (ganancia de peso) se graficaron en función del tiempo. De las rectas obtenidas se obtuvo la pendiente y la permeabilidad al vapor de agua se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{\left(\frac{\Delta w}{\Delta t}\right) \times \delta}{A \times \Delta P} \quad [1.4]$$

donde $(\Delta w/\Delta t)$ es la pendiente de la recta de ganancia de peso calculada mediante regresión lineal (expresada en g/s), δ es el espesor de la película (expresado en m), A es el área expuesta ($1,81 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$) y ΔP es la diferencia de presión parcial de vapor de agua a través de la película (1753,55 Pa a 20 °C). Las muestras se analizaron al menos por duplicado.

3.4.4. Solubilidad y contenido de humedad

La solubilidad de las películas se determinó en agua desionizada a dos temperaturas: 25 y 100 °C. Se cortaron muestras de 2 x 2 cm, se pesaron (peso seco inicial), se colocaron en vasos de precipitados conteniendo 80 mL de agua desionizada y se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm durante 1 h a la temperatura correspondiente (25 o 100 °C). Finalmente, las muestras se recuperaron por filtración y se secaron en estufa a 105 °C hasta peso constante (peso seco final).

El porcentaje total de materia soluble (% de solubilidad) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \left[\frac{(\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final})}{\text{Peso seco inicial}} \right] \times 100 \quad [1.5]$$

Para cada condición, las muestras se analizaron al menos por duplicado.

Por otra parte, el contenido de humedad se determinó gravimétricamente, se cortaron películas de 2 x 2 cm las que se pesaron, se secaron en estufa a 105 °C hasta peso

constante y se registró el peso de las mismas nuevamente. Los resultados se expresaron en porcentaje (%). Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

3.4.5. Propiedades mecánicas

Debido a que los materiales poliméricos cuentan con diferentes propiedades mecánicas según su naturaleza química, el comportamiento de los mismos cuando se someten a fuerzas externas es muy variable, dependiendo tanto de factores estructurales (estructura química, peso molecular, grado de cristalinidad, entrecruzamiento, etc.), como ambientales (temperatura y humedad relativa) y otras características de ensayo (Clark, 1985). La interpretación de estos aspectos aporta datos útiles y permite caracterizar las películas desarrolladas para su aplicación industrial; por ejemplo, la aplicación de polímeros con propiedades mecánicas deficientes podría causar daños tanto en el envase, como en el producto alterando su calidad.

Las características mecánicas de los materiales realizados en este trabajo de Tesis se obtuvieron mediante ensayos de tracción según lo propuesto por el método ASTM D882-02 (2002). La determinación implicó la separación, a velocidad constante, de los extremos de una probeta de película sostenida por mordazas, registrando al mismo tiempo la resistencia que el material ofrecía a esta deformación.

Los ensayos de tracción se realizaron con un texturómetro TA.XT2i-Stable Micro Systems (Surrey, Reino Unido), utilizando mordazas de tensión A/TG. Para la determinación se dispuso de probetas rectangulares de 0,6 cm de ancho y 7 cm de longitud, ensayando al menos 9 probetas por cada muestra. La velocidad de deformación aplicada a las películas fue de 1 mm/s en el ensayo y la de pre y post-ensayo fue de 5 mm/s.

Utilizando el software Texture Expert Exceed se registraron las curvas de fuerza (N) vs deformación (mm) a partir de las cuales se pudieron obtener los siguientes parámetros (Sarantópoulos y col., 2002):

- Fuerza de ruptura (N): fuerza registrada al momento de la ruptura.
- Esfuerzo de tensión (MPa): cociente entre la fuerza máxima y la sección transversal de la película (espesor por ancho de la probeta).

- Módulo elástico (MPa): relación entre la tensión y la deformación en la región lineal de la curva esfuerzo vs deformación.
- Elongación a la ruptura: relación entre la deformación al momento de la ruptura dividida por la longitud inicial de la probeta, expresada como porcentaje.
- Trabajo o energía de tracción para la ruptura: área bajo la curva de esfuerzo vs deformación, expresada en (J).

Las probetas que fueron sometidas a los ensayos de tracción se observaron al SEM con el fin de vincular el comportamiento mecánico del material y la microestructura de las películas resultantes. Se realizó la observación tanto de las superficies como de las secciones transversales de las probetas. Los estudios de la morfología de las películas se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (Dpto. de Mecánica, Facultad de Ingeniería, UNLP), por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200 (Japón) con detector de electrones Apollo 40, utilizando un voltaje de aceleración de 10 kV.

Las muestras se montaron en tacos de bronce con una cinta de carbono bifaz y se recubrieron con una capa de oro (40 - 50 nm), permitiendo así la visualización de las superficies y de las secciones transversales. Además, las observaciones SEM también permitieron evaluar el espesor de las películas.

Además, con el fin de comprobar la presencia de las NPs en las películas desarrolladas se utilizó la técnica de espectroscopia de dispersión de rayos X (EDX) utilizando una microsonda EDX y un detector EDAX[®]. La microsonda detecta el espectro de rayos X de cada elemento generado por el haz de electrones al incidir sobre la muestra, midiendo la concentración de los elementos y permitiendo un análisis químico. Esta herramienta se utilizó para detectar la presencia de Ag tanto en la superficie como en la sección transversal de las películas nanocompuestas.

3.4.6. Capacidad de termosellado

En la industria de los envases y embalajes, el sellado por calor es ampliamente utilizado para unir películas de polímero, y la capacidad de termosellado del material va a determinar además, la integridad del envase final. El termosellado es un proceso en el cual dos películas se presionan juntas entre placas o matrices calientes y a su vez se

ejerce presión. La superficie del polímero se funde debido al calor y la aplicación de presión durante un cierto tiempo da como resultado la aparición de interacciones interfaciales. Luego, al enfriarse se produce una unión termosellada debido a la solidificación del polímero (Nafchi, Cheng, y Karim, 2011). La resistencia del termosellado es una medida que se utiliza en el proceso de validación y control de materiales de envases, y depende del espesor de la película. Esta medida determina el funcionamiento del envase, y permite evaluar cómo se separan dos superficies selladas en un ensayo de resistencia a la tracción. La norma ASTM F 88-00 (2001) describe diferentes modos de falla: adhesiva, cohesiva, ruptura cerca o lejos del cierre, estiramiento y adhesiva + estiramiento (Figura 1.8).

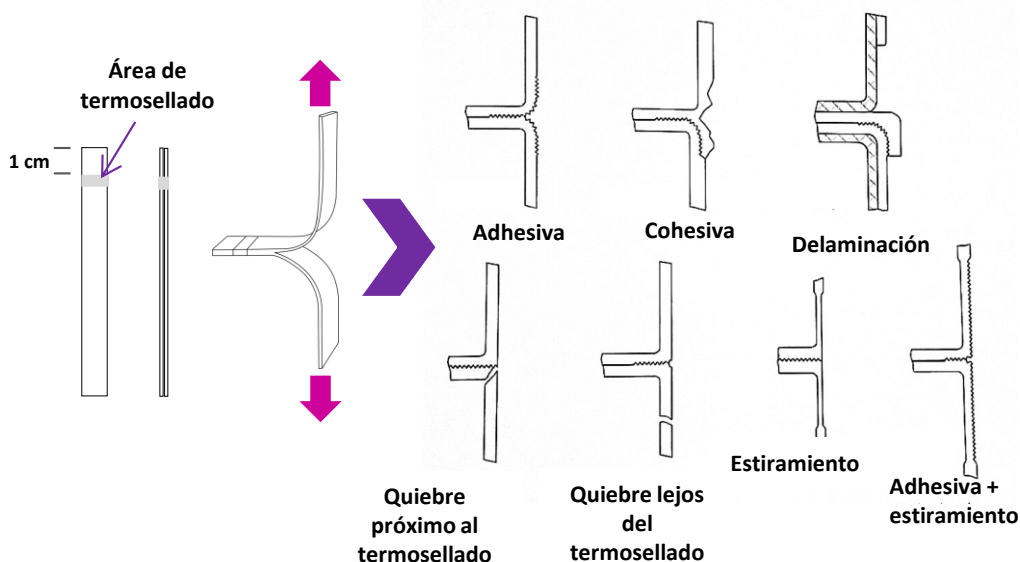


Figura 1.8: Ejemplos de fallas observadas en un ensayo de resistencia a la tracción de un material termosellado según la norma ASTM F 88-00 (2001).

Se evaluó la capacidad de termosellado de las películas con concentración de AgNPs de 143 ppm, utilizando una selladora térmica por impulso manual (Lipari, Rosario, Argentina) sobre muestras de 9 cm de diámetro.

La resistencia del termosellado, indicador de la calidad del cierre, se evaluó en el texturómetro previamente mencionado, equipado con un sistema de mordazas de tensión A/TG sobre probetas de 7 cm de longitud por 0,6 cm de diámetro siguiendo el protocolo descrito en Ortega y col. (2017). A continuación, se registraron los patrones

mecánicos y se determinaron los modos de falla de los cierres de acuerdo a la norma ASTM F 88-00 (2001).

Para las fallas donde la ruptura se produjo cerca del cierre, se calculó la resistencia máxima a la tracción, mientras que, para las fallas adhesivas, cohesivas o de delaminación se determinó la resistencia media del termosellado. Ambas resistencias fueron expresadas en MPa. Además, se calculó la energía necesaria para la ruptura del termosellado como el área bajo la curva de fuerza vs deformación, la que se expresó en J. Se analizaron 9 muestras y los resultados presentados corresponden al valor promedio y su desviación estándar.

3.4.7. Caracterización microestructural

3.4.7.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Una técnica sencilla y muy utilizada para obtener información sobre la estructura de un material polimérico es la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) ya que, la posición e intensidad de los picos que aparecen en el espectro están relacionados con los diferentes grupos funcionales presentes. Además de permitir identificar y conocer la estructura de una muestra, en el caso de materiales poliméricos aporta información sobre cambios estructurales provenientes de procesos de degradación, presencia de aditivos o aparición de nuevas especies en la superficie del material debido a algún tratamiento superficial aplicado. Asimismo, permite estudiar la compatibilidad e interacciones entre los componentes de la muestra.

En el área de los materiales poliméricos, la espectroscopía FTIR con accesorio de reflexión total atenuada (ATR) permite el análisis no destructivo de muestras debido a que éstas pueden presionarse suavemente sobre el cristal, ópticamente denso, y el haz IR va a interactuar con la muestra en la interfase. Esta técnica mide los cambios que ocurren en un haz reflejado internamente cuando éste entra en contacto con la muestra.

Los espectros IR de las películas desarrolladas para este trabajo de Tesis fueron obtenidos con un espectrómetro FTIR Nicolet-iS10 (Thermo Scientific, MA, EE.UU.) con

un accesorio ATR de diamante (Thermo Scientific, MA, EE. UU.). Las muestras se colocaron directamente sobre el cristal y se tomaron 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} en el rango de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$. Las mediciones se analizaron al menos por triplicado y los resultados se procesaron utilizando el software Omnic 9T^M (Thermo Scientific, EE. UU.). Se identificaron la posición de los picos principales del espectro y en el caso de la zona de la *huella digital* de azúcares, se analizó la región comprendida entre 1200 y 900 cm^{-1} a través de la deconvolución de las bandas obtenidas. A tal fin se utilizó la segunda derivada de los espectros para estimar el número, la posición y la contribución relativa de los componentes individuales a la banda espectral. La deconvolución espectral de los picos en la región mencionada, se realizó mediante el uso de algoritmos de ajuste teórico de curvas al espectro experimental. El ajuste se realiza generalmente utilizando la función resultante de la suma de funciones Gaussianas o Lorentzianas o una combinación de ambas.

3.4.7.2. Espectroscopía de difracción de rayos X

Un espectro de difracción de rayos X de un material semicristalino, como el almidón, se caracteriza por la presencia de picos de absorción y una zona de contribución amorfa, cuanto mayor es esta zona menor es el grado de cristalinidad de la muestra (Figura 1.9). Esta técnica permite obtener información sobre la estructura del material analizado ya que el diagrama de difracción es como una “huella dactilar” de las sustancias cristalinas.

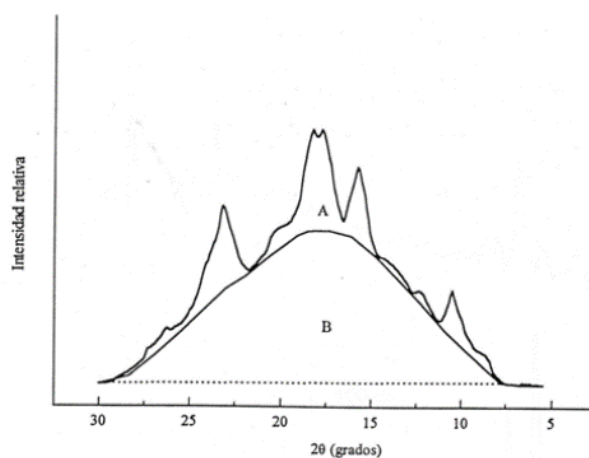


Figura 1.9: Diffractograma típico de un material semicristalino.

Para evaluar la cristalinidad de las películas, se utilizó un difractómetro X'Pert Pro PAnalytical Model PW 3040/60 (Almelo, Holanda) provisto de un tubo con un ánodo de CuK, que emite radiación de $\lambda=1,543$ nm, y un detector que operó con una voltaje de 40 kV y una corriente de 40 mA. Los difractogramas se obtuvieron desde $2\theta = 3^\circ$ hasta $2\theta = 60^\circ$. Para cuantificar la cristalinidad, se utilizó una adaptación del método propuesto por Hermans y Weidinger (1948) para materiales semicristalinos; en el cuál se estima, mediante una integración, la relación del área de los picos de absorción (que se atribuye a las regiones cristalinas) respecto al área total de la muestra (Ottenhoff, 2003). El grado de cristalinidad de una muestra puede calcularse como:

$$\text{Grado de cristalinidad (\%)} = \frac{A}{(A+B)} \times 100 \quad [1.6]$$

donde A corresponde al área de los picos de absorción y (A+B) es el área total del difractograma, determinadas mediante el procesamiento de los difractogramas con el programa Origin versión 8.5, (OriginLab Corporation, EE. UU.).

3.4.7.3. Transiciones térmicas: calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una de las técnicas más adecuadas para determinar las transiciones de fase en materiales orgánicos, inorgánicos o en productos alimenticios. Se toma una muestra de una masa conocida y se la somete a un programa de calentamiento o enfriamiento controlado para luego analizar los cambios que se producen en su capacidad calorífica a medida que se modifica el flujo de calor a fin de mantenerla a la misma temperatura que la referencia. Los cambios entálpicos se registran como endotermas o exotermas, según el proceso que sufra la muestra.

La calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC de sus siglas en inglés *modulated differential scanning calorimetry*), a diferencia de los analizadores térmicos convencionales, utiliza dos velocidades de calentamiento simultáneas, una velocidad de calentamiento lineal que brinda información similar al DSC estándar, y una velocidad de

calentamiento modulada o sinusoidal que permite medir simultáneamente la capacidad calorífica de la muestra y diferenciar entre los eventos reversibles (dependientes de la capacidad calorífica) e irreversibles (dependientes del tiempo y la temperatura) que experimenta la muestra. Además, una de las ventajas de la técnica de MDSC es que permite obtener una mayor resolución de transiciones complejas o eventos muy próximos al poder distinguir entre los eventos reversibles o no reversibles. Esto se debe a que en muchos casos, dependiendo de las características del material las transiciones térmicas se solapan en una misma región, no siendo posible diferenciarlos mediante la técnica de DSC convencional.

Para realizar los ensayos en este trabajo de Tesis se utilizó un calorímetro de barrido diferencial Q100 controlado por el módulo TA 5000 (TA Instruments, EEUU). Se pesaron aproximadamente 8 mg de películas en cápsulas de aluminio herméticas para evitar la pérdida de agua. Previo a la determinación, las muestras se acondicionaron a 25 °C y 70 % HR y como referencia se usó una cápsula vacía. Las muestras se calentaron desde -100 a 200 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, bajo una atmósfera de N₂ operando con un caudal de 20 mL/min. Para la modulación de la señal se utilizó un período de 40 s y una amplitud de 0,5 °C. De los termogramas obtenidos se obtuvo la temperatura de inicio (T_o), temperatura de pico (T_p), y entalpía asociada a dicha transición térmica (ΔH). Asimismo, la temperatura de transición vítrea (T_g) que corresponde a una transición de segundo orden se determinó como la temperatura en el punto medio de inflexión de la línea de base de la señal del flujo de calor reversible. Las muestras se analizaron al menos por duplicado.

3.5. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas

Las películas y recubrimientos que presentan capacidad antimicrobiana se enmarcan dentro del concepto de “envase activo” y se han desarrollado para reducir, inhibir o detener el crecimiento de microorganismos patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos. En el presente trabajo de Tesis se realizaron ensayos de inhibición utilizando diferentes microorganismos, cuidadosamente seleccionados como responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

3.5.1. Preparación de los inóculos

Para el preparado de los inóculos se aislaron cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* ATCC que se cultivaron en caldo nutritivo TSB (Caldo Triptona Soja), el cual favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, en especial las bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes. A continuación las cepas se incubaron a 37 °C durante 12 h, hasta alcanzar una concentración de 10^8 - 10^9 UFC/mL (UFC: Unidades Formadoras de Colonias) determinada por densidad óptica (DO). Luego se realizaron diluciones 1:10 de los inóculos con agua peptona al 1 % estéril. La cepa de *Penicillium spp.* ensayada se cultivó previamente en caldo triptona soja a 25 °C.

3.5.2. Determinación de la capacidad antimicrobiana

Con el fin de evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas desarrolladas con AgNPs frente a los microorganismos patógenos citados anteriormente, se realizaron ensayos de difusión en agar siguiendo el protocolo propuesto por Pranoto, Rakshit, y Salokhe (2005). Para el ensayo con las bacterias, se utilizaron placas con agar Mueller-Hinton (Merck), el cual es ampliamente utilizado para pruebas de sensibilidad. Las placas fueron inoculadas de manera estéril con 100 µL de una solución del cultivo original de los microorganismos a ensayar, diluida 4 veces. Sobre las mismas, y con ayuda de una pinza estéril, se colocaron dos discos de 2 cm de diámetro de cada una de las películas a ensayar. Todas las muestras se incubaron a 37 °C y se realizaron observaciones visuales y registros fotográficos a las 24, 48 y 72 h.

En el caso del *Penicillium spp.* se utilizó como medio de cultivo agar YGC (Extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol; Merck) que es selectivo para mohos y levaduras. Al igual que con las bacterias, se inoculó con 100 µL de una solución diluida 4 veces del cultivo original y luego se colocaron sobre cada placa dos discos de 2 cm de diámetro de película. Se incubaron en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, y se visualizaron a las 72 h y 5 días. Los ensayos fueron realizados al menos por duplicado en todos los casos.

3.6. Efecto del contenido de almidón sobre matrices nanocompuestas conteniendo AgNPs

Una vez que se obtuvieron y caracterizaron las películas nanocompuestas se decidió evaluar el efecto de la concentración de almidón nativo en la síntesis de de AgNPs *in situ* (143 ppm). Nuevamente se analizaron las características de las AgNPs sintetizadas *in situ*, se evaluó el comportamiento reológico de las suspensiones filmogénicas y las propiedades finales de las películas obtenidas que determinan su posible aplicación en el envasado de alimentos.

3.6.1. Síntesis de nanopartículas de plata acoplada a la suspensión filmogénica

Las nanopartículas de plata se sintetizaron *in situ* en la suspensión filmogénica según el método previamente optimizado (Sección 3.3). Se prepararon suspensiones filmogénicas con 1 y 5 % p/v de almidón de maíz nativo y se gelatinizaron a 90 °C durante 20 min, luego se agregaron 10 mL de AgNO₃ (6,5 10⁻⁴ M) y 20 mL de maltosa (1,3 10⁻³ M), los sistemas se mantuvieron bajo agitación constante durante 20 minutos a 90 °C. Las suspensiones gelatinizadas se enfriaron a 50 °C y se añadió glicerol como plastificante a una concentración de 30 % p/p.

Asimismo, se prepararon películas de almidón sin AgNPs (películas de control) reemplazando la solución de AgNO₃ por 10 mL de agua ultrapura.

3.6.2. Caracterización de las suspensiones filmogénicas

Para la caracterización microscópica y las medidas de potencial zeta (ζ), se prepararon suspensiones con una concentración mayor de AgNPs (500 μ M) que contenían 1, 3 y 5 % p/v de almidón soluble, para mejorar la visualización al igual que se realizó anteriormente en la Sección 3.1.

3.6.2.1. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM)

La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) se realizó en un equipo TALOS F200X S/TEM (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) equipado con una sonda para análisis de espectroscopía de rayos X dispersivos de energía (EDX) para observar las características de las nanopartículas de plata (morfología y tamaño) realizando

además un mapeo de elementos. Las observaciones de HR-TEM se llevaron a cabo como se detalló previamente (Sección 3.3.2).

3.6.2.2. Potencial Z

El potencial Z se determinó según lo descrito en la Sección 3.2.4 acorde a lo mencionado en Ortega y col. (2019).

3.6.2.3. Caracterización reológica de las suspensiones filmogénicas

Conocer el comportamiento reológico de las suspensiones filmogénicas es de suma importancia ya que permite determinar cuáles son las condiciones óptimas de procesamiento para obtener películas a escala industrial. Además, en el caso de suspensiones nanocompuestas ayuda a comprender la relación estructura-propiedad entre el polímero, en este caso, y las nanopartículas incorporadas (Han, 2014; Romero-Bastida et al., 2018).

Las propiedades reológicas de un fluido están definidas por la relación que existe entre un sistema de fuerzas externas y su respuesta. Estas fuerzas externas están representadas matemáticamente por el esfuerzo de corte o de cizalladura " τ ", y la respuesta dinámica del fluido se cuantifica a partir de la velocidad de deformación, " $\dot{\gamma}$ ".

La caracterización reológica de suspensiones filmogénicas se realizó en un reómetro Rheo Stress 600 ThermoHaake (Haake, Alemania) con un sensor placa-placa PP35 a temperatura constante controlada (20 °C) y una distancia de separación fija (1 mm). El modo rotacional se utilizó para investigar el comportamiento del flujo de las suspensiones filmogénicas de control y nanocompuestas (López, Zaritzky, y García, 2010). A tal fin, la muestra se colocó en el sensor, se dejó en reposo durante 1 min y luego se aumentó la velocidad de deformación de 0 a 500 s⁻¹ durante 3 min (rama ascendente), se mantuvo 1 min a esa velocidad de deformación y posteriormente la misma disminuyó hasta 0 s⁻¹ en 3 min (rama descendente).

Las curvas de esfuerzo de corte (τ) vs velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) se modelaron como fluidos newtonianos ($\tau = \eta\dot{\gamma}$) u Ostwald de Waele ($\tau = K\dot{\gamma}^n$), donde η es la viscosidad del fluido newtoniano; K es el índice de consistencia y n es el índice de flujo. Para sistemas no newtonianos, la viscosidad aparente se calculó en 500 s⁻¹. Para evaluar la

dependencia del comportamiento reológico con el tiempo se determinaron los índices tixotrópicos o antitixotrópicos (Pa s^{-1}), que corresponden al área de histéresis entre las curvas ascendente y descendente (López, García, y Zaritzky, 2008). Las mediciones se realizaron al menos por duplicado para cada formulación.

3.6.2.4. Cinética de secado

La formación de películas poliméricas ocurre por evaporación del solvente en la técnica de *casting*, involucrando fenómenos de transferencia de calor y masa, además de reorganización de cadenas poliméricas. Debido a esto, tener conocimiento sobre los fenómenos que ocurren durante el proceso de secado es fundamental cuando se intenta reducir el tiempo del proceso y consumo de energía. Las películas biodegradables generalmente se obtienen por la técnica clásica de *casting*, pero ésta presenta dos desventajas importantes; por un lado se encuentra la dificultad de realizar una producción a gran escala y obtener un producto de mayor tamaño, y por otro, los tiempos más largos necesarios para el secado óptimo del material. Para superar estas dificultades desde hace unos años se ha propuesto al *tape-casting* (secado sobre un soporte, que puede ser una cinta transportadora) como un procedimiento adecuado para el escalado industrial de las películas biodegradable (Moraes, Scheibe, Sereno, y Laurindo, 2013; Moraes, Scheibe, Augusto, Carciofi, y Laurindo, 2015). En ambos casos, conocer la cinética de secado de las suspensiones filmogénicas a fin de obtener las películas nanocompuestas es condicionante.

Se obtuvieron películas como se mencionó en la Sección 3.3, las suspensiones filmogénicas se colocaron en placas y se secaron a 50 °C. Para evaluar la cinética de secado de las suspensiones filmogénicas control y nanocompuestas, se determinó la pérdida de peso de las muestras durante el secado pesando las placas de Petri con 20 g de suspensión filmogénica, exactamente pesados, a intervalos de 60 min.

Los resultados se expresaron como la relación entre la masa en un momento t (M) con respecto a la masa inicial (M_0) y se ajustaron al siguiente modelo empírico:

$$\frac{M}{M_0} = 100 \exp(-kt) \quad [1.7]$$

Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado. Las películas obtenidas se acondicionaron a 70% HR y 25 °C durante 4 días previo a su caracterización.

3.6.3. Caracterización de las películas

La caracterización de las películas control y nanocompuestas se realizó siguiendo las metodologías mencionadas previamente, espesor (3.4.1), propiedades ópticas (3.4.2), WVP (3.4.3), solubilidad (3.4.4), propiedades mecánicas (3.4.5), ATR-FTIR (3.4.7.1) y capacidad antimicrobiana (3.5).

3.7. Aplicación de las películas activas desarrolladas sobre alimentos

Entre los envases activos, el interés por los materiales antimicrobianos ha aumentado significativamente, ya que, constituyen una opción complementaria y prometedora al uso de los métodos tradicionales de conservación que controlan los microorganismos indeseables en los alimentos. Particularmente, los envases antimicrobianos han sido diseñados para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y de aquellos que pueden acelerar la descomposición de los productos envasados y, por lo tanto, contribuir, junto con la protección física, a la extensión de la vida útil de los alimentos que contienen.

La nanotecnología ofrece nuevas posibilidades al desarrollo de sistemas de envasado antimicrobiano o, mejoras a la actividad antimicrobiana de sustancias activas conocidas. Como ya se ha mencionado, la alta relación superficie-volumen y la actividad superficial de los agentes antimicrobianos de tamaño nanométrico pueden combatir los microorganismos no deseados con mayor eficacia que sus homólogos a micro o macro-escala (Yildirim y Röcker, 2018). En este sentido, la plata en nanoescala (AgNPs) ha sido ampliamente utilizada debido a sus propiedades antimicrobianas.

Con el fin de evaluar la efectividad de las películas activas desarrolladas con AgNPs *in situ*, las mismas se utilizaron para el envasado de un producto lácteo de humedad intermedia. Se tomaron porciones regulares de un queso comercial de pasta blanda y se cubrieron a ambos lados con películas de almidón de maíz, plastificadas con glicerol y conteniendo AgNPs *in situ* (143 ppm). Para obtener los envases las películas fueron

termoselladas como se describió previamente. Se emplearon porciones de queso fresco depositadas sobre placas de Petri como controles. Todas las muestras se colocaron en bolsas sintéticas de PD 141(CRYOVAC®). Esta es una película sintética a base de polietileno de baja densidad de 75 µm de espesor, especialmente diseñada para el envasado de alimentos frescos refrigerados ya que presentan velocidades de transmisión de oxígeno y dióxido de carbono elevadas que permiten controlar la respiración de los productos.

Las muestras de queso control y envasadas con las películas desarrolladas se almacenaron a 4 °C, se realizó el recuento de hongos y levaduras a tiempo inicial y luego de 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento. Para ello se tomaron 10 g de queso que se homogeneizaron en un Stomacher Seward Modelo 400 (Inglaterra) con 90 mL de agua peptona al 0,1 % estéril. Para disminuir el error del muestreo se realizaron duplicados del homogenato. Se sembraron 100 µL del homogenato en medio YGC (Extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol) y las placas se incubaron 5 días a 25 °C.

Los recuentos de microorganismos viables se determinaron por conteo del número de colonias formadas, expresándose los resultados como UFC/g de queso. Además con el fin de identificar el género predominante en los microorganismos presentes, se realizó la tinción de Gram correspondiente.

3.8. Análisis estadístico

Se realizaron análisis multifactoriales de varianza mediante el uso del software Systat (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, EE. UU.) versión 10.0 e InfoStat versión 2017 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). 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 $\alpha=0.05$. También se empleó el programa mencionado para el cálculo de regresiones lineales y no lineales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de las nanopartículas

La optimización de las condiciones de síntesis así como la cinética del proceso se siguió a través de espectrofotometría UV-visible. Esta técnica permite determinar la longitud de onda característica del plasmón de resonancia superficial (SPR) de las AgNPs, el cual refleja la longitud de onda que hace que la nube de electrones que se encuentra alrededor de estas nanopartículas metálicas se polarice por efecto de la luz incidente (Kerker, 1985). Para las nanopartículas de plata el plasmón característico se encuentra en el rango de 400 - 450 nm (Kerker, 1985; Morales y col., 2009; Slistan-Grijalva y col., 2005).

En primer lugar se registraron los espectros UV-visible para las suspensiones de nanopartículas preparadas con almidón soluble al 1% p/v, utilizando concentraciones de AgNO_3 y maltosa 1 M. En la Figura 1.10 se puede observar la presencia del plasmón característico mencionado anteriormente, con un máximo de absorbancia en 423 nm, el cual presenta un leve corrimiento hacia longitudes de onda mayores (426 nm) para la muestra obtenida con maltosa 2M (Figura 1.10b). Esto confirma la formación de las AgNPs con el método propuesto. La amplitud observada en el plasmón puede deberse a la distribución heterogénea en el tamaño de las NPs como ha sido reportado por otros autores, y por la presencia de almidón como agente estabilizante (Khan y col., 2013; Slistan-Grijalva y col., 2005).

El pico que presenta la solución de AgNO_3 a 300 nm (Figura 1.10a) se debe a la absorción UV-visible típica de la solución según lo reportado por Peng y col. (2018). Con respecto al tiempo de síntesis, 20 min son suficientes para que las AgNPs se formen.

Cuando la síntesis de las nanopartículas ocurre en condiciones donde el reductor duplica la concentración de AgNO_3 , se observa un ligero aumento en la intensidad del plasmón característico y del ancho de banda del mismo, lo que indicaría que si bien aumenta la cantidad de nanopartículas formadas aumentaría su polidispersidad. Según lo estudiado por Khan y col. (2013), tanto la posición del pico máximo como la forma de los espectros de las nanopartículas de plata, dependen de las condiciones experimentales de síntesis,

es decir, de la naturaleza del agente reductor, el método de preparación, la acidez de la mezcla de reacción y de la ausencia/presencia de agentes estabilizantes.

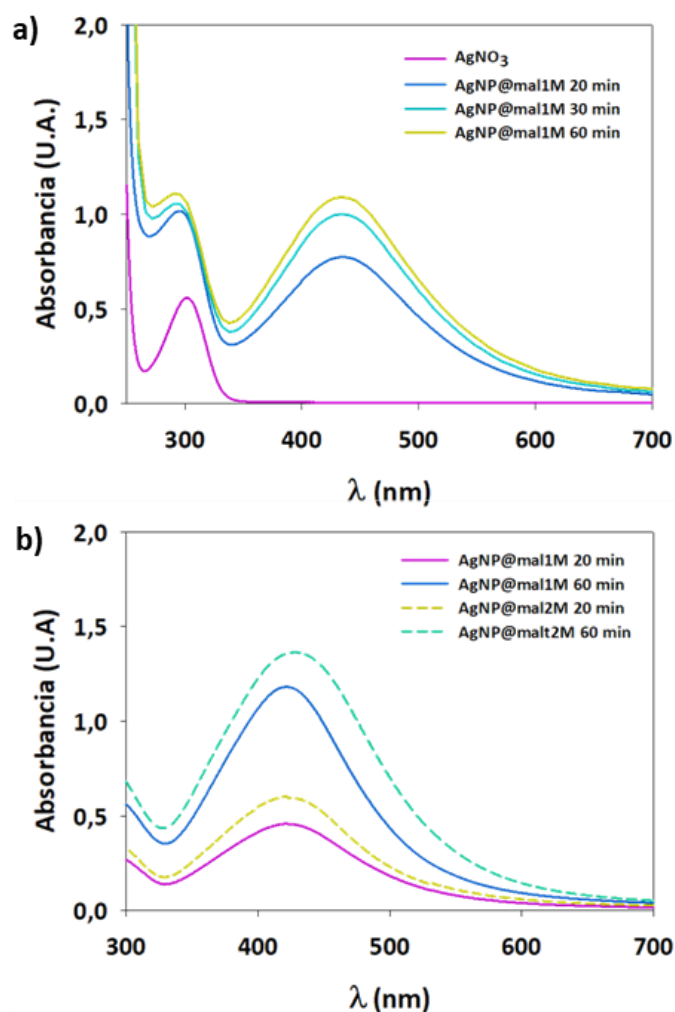


Figura 1.10: a) Formación de AgNPs utilizando maltosa 1 M como agente reductor a diferentes tiempos. b) Espectros de absorción UV-visible a distintos tiempos de AgNPs obtenidas con maltosa 1 y 2M.

Considerando que el objetivo de este Capítulo es el acoplamiento de la síntesis de las nanopartículas a la preparación de la suspensión filmogénica para obtener los films nanocompuestos, se realizó la síntesis de AgNPs a partir de AgNO₃ y maltosa 1M utilizando almidón nativo al 1 % p/v.

En la Figura 1. 10a, se puede ver que prácticamente no hay diferencias en los espectros de las suspensiones coloidales conteniendo las AgNPs sintetizadas *in situ*, utilizando

almidón de maíz nativo luego de una semana de almacenamiento. Aunque no es el propósito de este trabajo de Tesis, se podría considerar la posibilidad de preparar la suspensión filmogénica nanocompuesta y formular las películas en el transcurso de una semana sin que se alteren las AgNPs incluidas, debiendo estudiarse la retrogradación del almidón en esas condiciones.

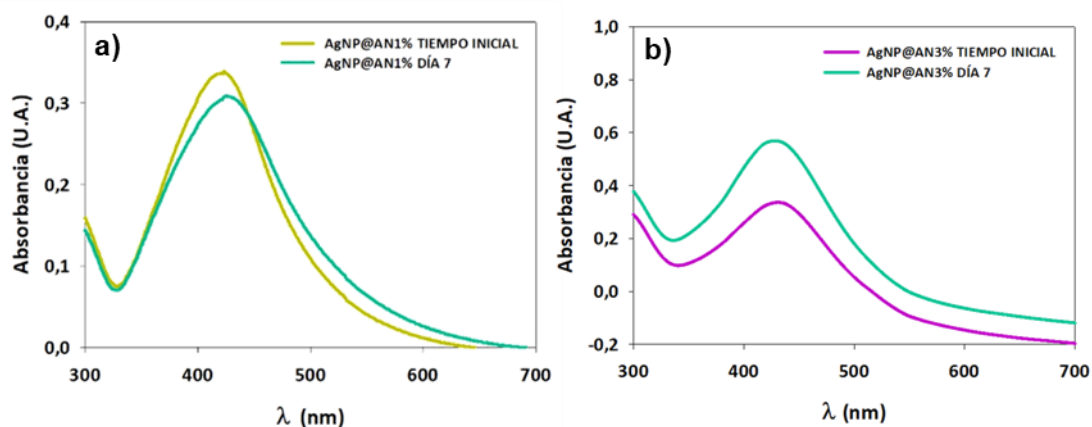


Figura 1.10: a) Espectros de absorción UV-visible de las AgNPs sintetizadas en almidón de maíz nativo 1% inicialmente y luego de una semana. b) Evolución de las AgNPs con almidón al 3% luego de una semana de almacenamiento.

La existencia del plasmón confirmó la presencia de AgNPs sintetizadas *in situ*, la eficiencia del acoplamiento de la síntesis y la preparación de la suspensión filmogénica (Figura 1.10b). La amplitud observada del plasmón puede atribuirse a las interacciones de las NP con la matriz, o a una posible aglomeración de las mismas. Los grupos -OH hidrófilos fueron responsables de la adsorción de almidón en la superficie de las AgNPs a través de interacciones electrostáticas, esta hipótesis concuerda con lo propuesto por otros autores (Cheviron y col., 2014; Vigneshwaran, Nachane, Balasubramanya, y Varadarajan, 2006).

Con el fin de conocer la morfología de las nanopartículas sintetizadas, las mismas fueron estudiadas mediante TEM y SEM. Las observaciones por TEM mostraron que las nanopartículas obtenidas son de forma esférica (Figura 1.11), con un tamaño medio de $14,2 \pm 4,4$ nm, el cual fue determinado con el software ImageJ (Schneider y col., 2012) basado en el recuento total de 450 nanopartículas (Cheviron y col., 2014; Cheviron y

col., 2015). La polidispersidad calculada para la muestra fue de 0,32. Se ha señalado que los valores de polidispersidad alrededor de 0,1 reflejan una población monodispersa homogénea, y si son mayores que 0,3 indican una mayor distribución de tamaños, así como una mayor tendencia a la aglomeración de las NPs (Sánchez-García y col., 2016). Así la polidispersidad de la muestra permitiría explicar que en algunos casos se observó que las AgNPs se encontraban formando aglomerados en la matriz de almidón.

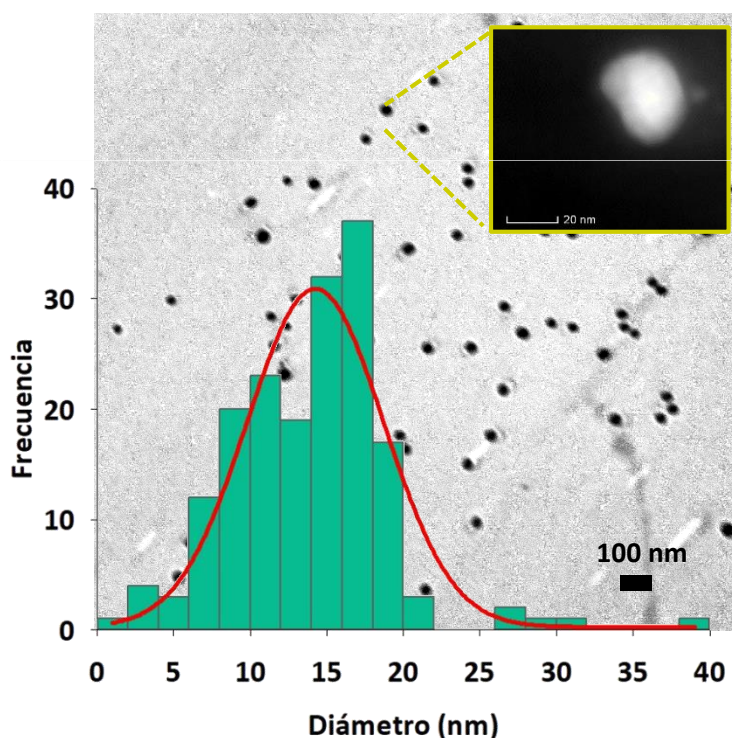


Figura 1.11: Micrografía de TEM de las AgNPs con el histograma obtenido asociado. La imagen incluye una micrografía S-TEM de las nanopartículas.

En la Figura 1.12 se observa una micrografía de SEM que evidencia una distribución uniforme de las NPs, las cuales se presentan como puntos brillantes, en la matriz de almidón; además, se muestra que las AgNPs tienden a aglomerarse en ciertos sectores, probablemente debido a su tamaño pequeño y a su polidispersidad (Ortega y col., 2017). Las observaciones por microscopía electrónica permiten confirmar además que la técnica de TEM (Figura 1.11) resultó ser una herramienta de caracterización de las AgNPs sintetizadas de mayor precisión que la de SEM (Figura 1.12).

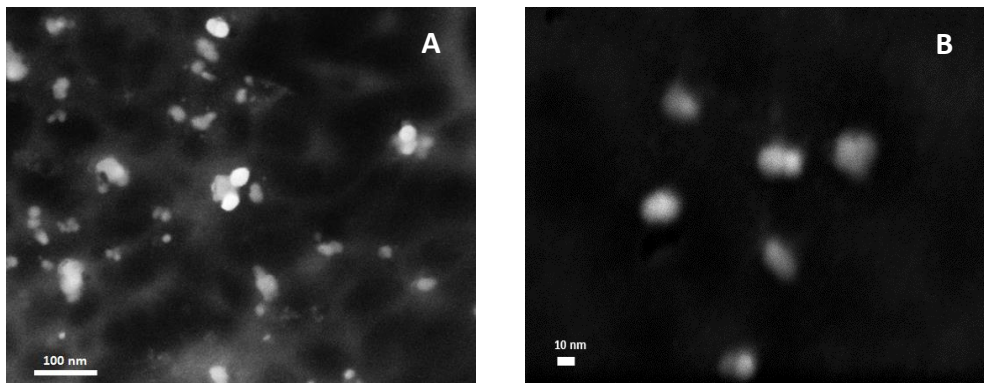


Figura 1.12: Micrografías electrónicas de barrido obtenidas por evaporación del solvente para una suspensión de AgNPs preparadas en almidón de maíz: **a)** visualización panorámica de las nanopartículas en la suspensión, **b)** aumento de las AgNPs en la solución. Las nanopartículas se observan como manchas blancas brillantes.

Las medidas de potencial Z revelaron información sobre la carga superficial de las AgNPs sintetizadas, lo cual permitió evaluar la magnitud de las atracciones/repulsiones de cargas entre las nanopartículas y así conocer de qué forma se encontraba afectada la estabilidad de las mismas. El valor obtenido para las muestras fue de -12,7 mV al pH de la suspensión filmogénica (pH= 5,5). El valor negativo obtenido, indica el efecto de *capping* sobre la superficie de la plata por las cadenas de almidón. Cuando se reducen sales de cationes metálicos a sus correspondientes nanopartículas metálicas utilizando azúcares, estos se oxidan a los ácidos correspondientes y los ácidos compensan las fuerzas de Van Der Waals entre las partículas al generar una carga negativa alrededor de éstas, evitando así su aglomeración. Singh, Bharti, y Meena (2014) informaron valores de potencial Z comprendidos entre -5 mV para AgNPs esféricas y -15 mV para AgNPs anisotrópicas sintetizadas por reducción de AgNO_3 0,3M con maltosa y estabilizadas con polivinilpirrolidona (PVP). Varios autores han propuesto que, los terminales aldehído de la maltosa son los responsables de reducir el ion Ag^+ a Ag^0 , mientras que las asociaciones intra- e intermoleculares de la red de almidón proporcionan dominios para el crecimiento de las nanopartículas, y los grupos hidroxilo ayudan a pasivar la superficie de las AgNPs, ya que sino tenderían a agregarse debido a la elevada energía superficial (Chevion y col., 2014; Gao, Wei, Yan, y Xu, 2011; Raveendran, Fu, y Wallen, 2006). Por

otro lado, Oluwafemi y col. (2013) plantea que la maltosa, actuando como agente reductor, se hidroliza dando dos moléculas de glucosa. Los grupos aldehído reducen el Ag^+ a Ag^0 en tanto que la glucosa se oxida a ácido glucónico generando H^+ que aumentan la velocidad de reacción. A su vez, se da una hidrólisis parcial del almidón lo cual permite tener un mayor número de NPs de menor tamaño al inicio de la reacción.

4.2. Obtención de las películas nanocompuestas

Con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano de materiales desarrollados a base de almidón de maíz incluyendo en su formulación nanopartículas de plata, se elaboraron películas de almidón de maíz nativo 3 % p/v utilizando como plastificante glicerol (30 % p/p respecto a la masa de almidón) e incluyendo diferentes concentraciones de nanopartículas: 5 μM ; 10 μM ; 25 μM y 50 μM sintetizadas *in situ* en la formulación filmogénica que equivalen a 14,3; 28,6; 71,5 y 143 ppm en el material nanocompuesto.

Visualmente el agregado de las AgNPs no afectó la capacidad filmogénica de la suspensión. En todos los casos se obtuvieron películas homogéneas, incoloras y transparentes, las que podían ser removidas fácilmente de la placa que las contenía (Figura 1.13).

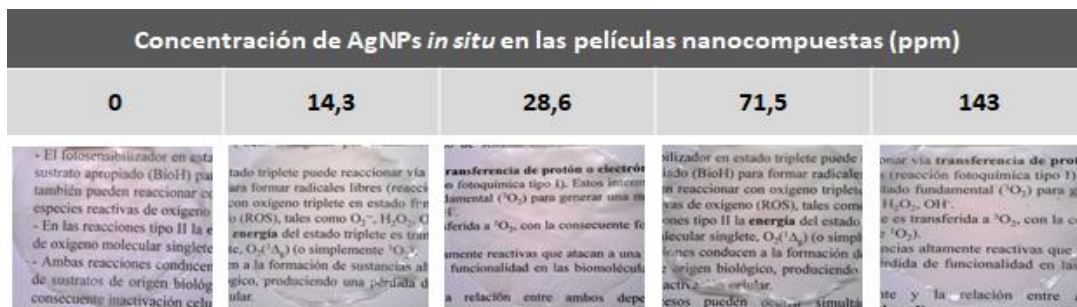


Figura 1.13: Fotografías de las películas desarrolladas con diferente contenido de AgNPs *in situ*: control (0 ppm); 14,3; 28,6; 71,5 y 143 ppm.

4.3. Caracterización de las películas desarrolladas

4.3.1. Determinación del espesor

Generalmente la caracterización fisicoquímica de un material polimérico incluye la determinación de su espesor, ya que, éste condiciona sus propiedades, principalmente las mecánicas y de barrera. El ANOVA indicó que el espesor de las películas fue afectado significativamente ($p < 0,05$) por la incorporación de las nanopartículas (Tabla 1.1). En general, las películas que incluyeron AgNPs en la matriz presentaron un mayor espesor con respecto a la película de almidón utilizada como control, a pesar de que en todos los casos se mantuvo constante la relación de moldeo (área de la placa:masa de suspensión filmogénica). Kanmani y Rhim (2014a) encontraron un efecto similar trabajando con películas de gelatina a las cuales se les incorporó AgNPs y nanoarcillas. La posible aglomeración de las AgNPs sintetizadas, evidenciada por TEM y al SEM (Figura 1.11 y 1.12), podría explicar los resultados obtenidos.

Tabla 1.1: Espesor y parámetros de color superficial (a^* , b^* y L^*) determinados para las películas de almidón de maíz control y nanocompuestas

Muestra	Espesor (μm)	a^*	b^*	L^*
Cont	$87,90 \pm 5,0^a$	$-0,38 \pm 0,01^b$	$2,86 \pm 0,13^a$	$97,44 \pm 0,09^c$
14,3 ppm	$103,0 \pm 5,9^b$	$-0,36 \pm 0,06^b$	$3,12 \pm 0,15^b$	$97,36 \pm 0,10^c$
28,6 ppm	$91,30 \pm 6,1^a$	$-0,32 \pm 0,05^b$	$3,28 \pm 0,10^b$	$96,76 \pm 0,05^b$
71,5 ppm	$103,6 \pm 5,6^b$	$-0,10 \pm 0,03^a$	$3,55 \pm 0,08^c$	$96,62 \pm 0,07^a$
143 ppm	$102,0 \pm 6,7^b$	$-0,13 \pm 0,05^a$	$3,09 \pm 0,08^{a,b}$	$96,57 \pm 0,05^a$

Se informan los valores medios \pm la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.2. Propiedades ópticas

Tanto el color como la opacidad y/o transparencia, son factores importantes a tener en cuenta en el desarrollo de materiales destinados al envasado de alimentos, ya que, pueden influir en la decisión del consumidor a la hora de elegir un producto.

Los valores de los parámetros de color superficial para las películas nanocompuestas y control se muestran en la Tabla 1.1. Los resultados indican que tanto la incorporación como la concentración de AgNPs afectaron significativamente ($p < 0,01$) los parámetros de cromaticidad (a^* y b^*), aunque en ambos casos los valores correspondientes fueron muy bajos y visualmente las películas nanocompuestas se percibieron en todos los casos incoloras (Figura 1.13). El aumento percibido en el parámetro b^* podría atribuirse a la reacción química de pardeamiento sufrida por la presencia de las nanopartículas y exceso de maltosa presente en la matriz, siendo éste el agente reductor requerido para la síntesis de AgNPs. Sin embargo, no se observó una tendencia clara con respecto al aumento del contenido de AgNPs, probablemente debido a las concentraciones tan bajas utilizadas en el presente trabajo de Tesis. Tanto Abreu y col. (2015) como Cheviron y col. (2014), informaron un aumento significativo en este parámetro y, por lo tanto, en el cambio de color de transparente a amarillo/naranja para películas de nanocompuestas conteniendo concentraciones de nanopartículas del orden de 1 mM.

En lo que respecta al parámetro de luminosidad (Tabla 1.1), también se encontró un efecto muy significativo ($p < 0,01$) con el agregado de las AgNPs, observándose una disminución de dicho parámetro con el aumento de la concentración de las mismas. Cano y col. (2016) informaron un comportamiento similar con el agregado de nanopartículas de plata a películas de almidón-PVA.

La Figura 1.14 muestra la diferencia de color (ΔE) para todas las formulaciones ensayadas, en donde se puede observar que el agregado de AgNPs y el aumento de su concentración, generan un efecto muy significativo ($p < 0,01$) en dicho parámetro. Si bien hay un incremento, los bajos valores de ΔE indicarían que las películas desarrolladas son prácticamente incoloras, resultados que se correlacionan con las observaciones visuales de las muestras (Figura 1.13).

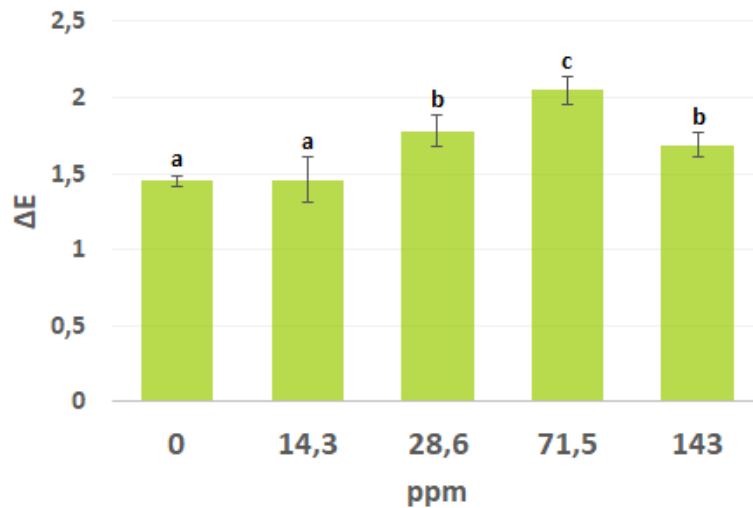


Figura 1.14: Diferencias de color para las películas de almidón control (0) y con diferentes concentraciones de AgNPs sintetizadas *in situ*.

La capacidad de absorción de luz UV por parte de las películas permite determinar su posible aplicación en el envasado de alimentos, ya que, las películas que absorben permiten prolongar la vida útil de alimentos que son alterados por esta radiación, por ejemplo, los que cuentan con un alto contenido de materia grasa. Todas las películas presentaron capacidad de barrera a la luz UV. En la Figura 1.15a se muestra que esta capacidad es dependiente del contenido de AgNPs en la película hasta una concentración de 28,6 ppm, asemejándose a la película control a concentraciones mayores.

Como ya se mencionó, tanto la opacidad como la transparencia, son propiedades críticas cuando las películas se utilizan como recubrimientos o para el envasado de alimentos. Según Garcia, Pinotti, y Zaritzky (2006) las películas transparentes se caracterizan por espectros con bajos valores del área bajo la curva en la zona de 400 - 800 nm. Además, la transparencia se considera como un parámetro que indica la compatibilidad en el caso de materiales compuestos (Zolfi y col., 2014). Las Figura 1.15 a y b exhiben los valores de opacidad y transparencia de las películas, calculados a partir de los espectros de absorción obtenidos de la región visible; y se puede ver que, tanto las AgNPs como su concentración no afectaron significativamente ($p > 0,05$) a estos parámetros en los materiales desarrollados. Los valores de opacidad obtenidos para las películas nanocompuestas fueron en general cercanos a los informados para las películas a base de almidón. Por ejemplo, Bertuzzi y col. (2012) informaron valores entre 160 y 320 UA x

nm para películas de almidón con alto contenido de amilosa; mientras que los valores obtenidos para la transparencia fueron similares a los de las películas compuestas formuladas con colágeno y almidón de maíz waxy (Wang y col., 2017). Por otro lado, los valores de opacidad obtenidos resultaron mayores que los correspondientes a películas sintéticas utilizadas comúnmente para envases (polietileno de baja densidad, LDPE, 3,05 mm⁻¹ y dicloruro de polivinilo, PVDC, 4,58 mm⁻¹). Esta característica de las películas nanocompuestas con AgNPs resulta interesante ya que permitirían proteger más eficazmente al producto contenido en el envase contra la luz y así contribuirían a mejorar la calidad de los alimentos envasados extendiendo su vida útil (Ortega y col., 2017).

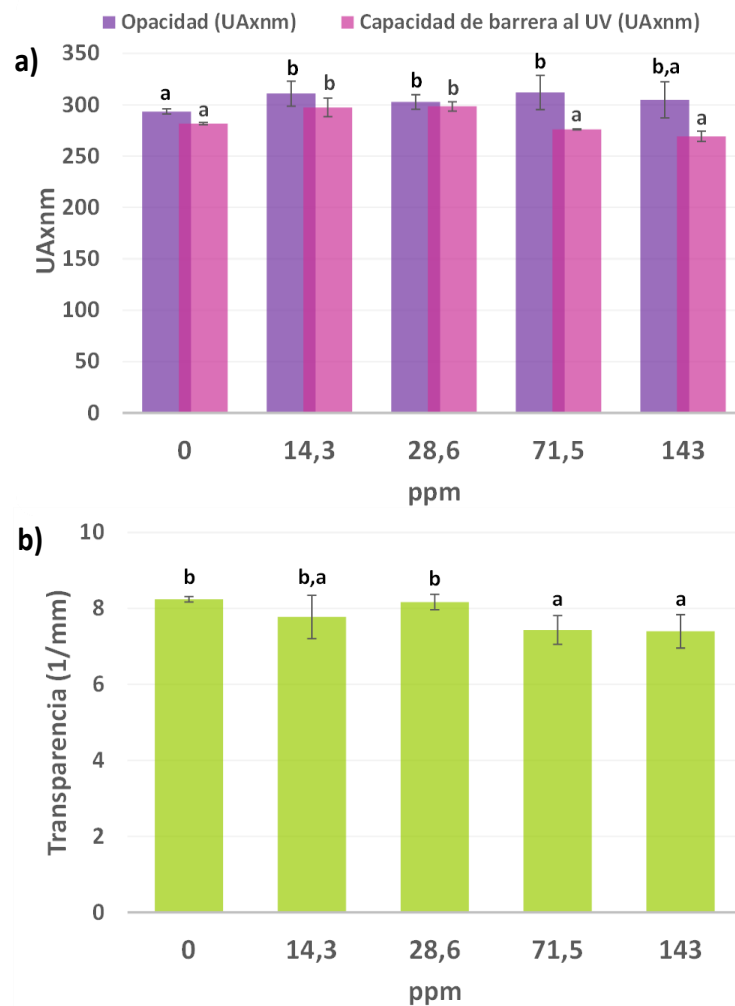


Figura 1.15: a) Capacidad de barrera al UV y opacidad b) transparencia de las películas control (0) y formuladas con diferentes concentraciones de AgNPs *in situ*.

4.3.3. Permeabilidad al vapor de agua

Como se indicó anteriormente es muy importante la determinación de la WVP ya que define la calidad organoléptica y microbiológica del alimento envasado. En general en el diseño de envases se prefieren materiales con bajos valores de WVP. Sin embargo, en algunas ocasiones son necesarios materiales con una baja barrera al vapor de agua ya que estos permiten el movimiento de humedad a través de la película, evitando la condensación de agua y alteración del producto (Garcia, Martino, y Zaritzky, 1998).

La Tabla 1.2 indica que la incorporación de AgNPs causó una reducción muy significativa ($p < 0,01$) en la WVP, pero no se observaron efectos significativos a concentraciones superiores a 14,3 ppm. Este comportamiento podría atribuirse al aumento de la tortuosidad de la matriz polimérica. Cheviron y col. (2015) observaron una tendencia similar trabajando en películas a base de almidón de papa conteniendo nanopartículas de plata sometidas a un tratamiento térmico. Con respecto a otras películas nanocompuestas, se ha mencionado la tortuosidad como el factor principal que permite explicar el mejoramiento de las propiedades de barrera de las mismas (Abreu y col., 2015; Kanmani y Rhim, 2014a; Rhim y col., 2013). Del mismo modo, Ludueña, Vázquez, y Alvarez (2012) indicaron que la transmisión de vapor de agua a través de un material es un equilibrio de tres mecanismos principales: la *crystalinidad* de la película, la *tortuosidad* de los caminos a través de la matriz polimérica y la *presencia de defectos* estructurales en la superficie.

Con el fin de caracterizar la microestructura de la película, se realizó un análisis al SEM. Las micrografías de las películas nanocompuestas (Figura 1.16) muestran superficies homogéneas, lisas y uniformes, sin grietas, poros o imperfecciones, independientemente de la adición de las NPs y su concentración. Además, no se detectó migración de glicerol a la superficie, lo que indica la compatibilidad polímero-plastificante. Los cortes transversales observados indicaron estructuras compactas y uniformes (Figura 1.18). Por lo tanto, las observaciones al SEM refuerzan la hipótesis del aumento de la tortuosidad de la matriz polimérica para explicar los bajos resultados de WVP en las películas nanocompuestas.

Sin embargo, y como era de esperar, los valores de WVP obtenidos en este caso son mayores que el informado para el polietileno de baja densidad (LDPE) ($8 \cdot 10^{-12} \text{ g/m s Pa}$), el polímero sintético más comúnmente utilizado para el envasado de alimentos (García y col., 2006; Sandhu, Sharma, Kaur, y Kaur, 2020).

Tabla 1.2: Variación en la permeabilidad al vapor de agua (WVP), solubilidad y contenido de humedad para las películas control y nanocompuestas con diferentes concentraciones de AgNPs *in situ*.

Muestra	WVP ($10^{-10} \text{ g/m s Pa}$)	Solubilidad (%)		Contenido de Humedad (%)
		25 °C	100 °C	
Cont	$2,9 \pm 0,2^c$	$39,2 \pm 4,9^c$	$100,0 \pm 0,0^d$	$22,6 \pm 3,4^{c,b}$
14,3 ppm	$2,2 \pm 0,1^b$	$34,4 \pm 0,2^b$	$34,8 \pm 0,8^a$	$20,6 \pm 0,2^b$
28,6 ppm	$1,6 \pm 0,3^a$	$30,9 \pm 2,5^a$	$43,3 \pm 4,1^b$	$20,6 \pm 0,8^b$
71,5 ppm	$1,9 \pm 0,3^{a,b}$	$28,8 \pm 1,6^a$	$48,4 \pm 7,1^{b,c}$	$25,0 \pm 0,09^a$
143 ppm	$1,9 \pm 0,1^{a,b}$	$29,0 \pm 0,5^a$	$52,4 \pm 2,6^c$	$17,0 \pm 1,9^a$

Se informan los valores medios \pm la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

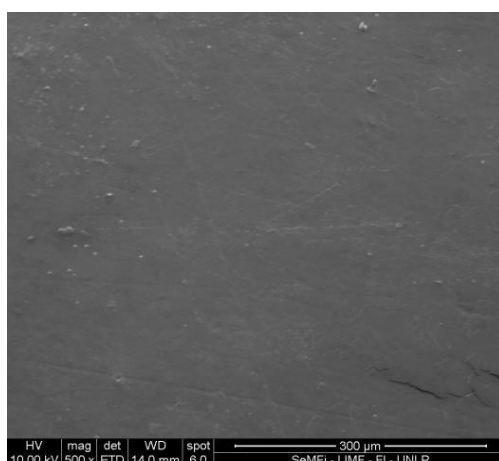


Figura 1.16: Microscopía electrónica de barrido de la superficie de una película de almidón de maíz con agregado de AgNP *in situ* (28,6 ppm). La magnificación utilizada se indica en la micrografía.

4.3.4. Solubilidad y contenido de humedad

La solubilidad en agua es una propiedad importante que se relaciona con el futuro uso de la película. Por ejemplo, si se quiere que aporte resistencia a la humedad e integridad al producto, se preferirá una película insoluble, si se plantea una aplicación donde el producto envasado se somete a cocción, un material más soluble puede ser una opción interesante. Los resultados obtenidos de solubilidad de las películas se presentan en la Tabla 1.2.

En general, la solubilidad de la película disminuyó al aumentar el contenido de AgNPs, siendo este efecto significativo ($p < 0,05$) a 25 °C y volviéndose muy significativo ($p < 0,01$) a 100 °C. A 25 °C, las películas fueron en promedio 31 % solubles, mientras que a 100 °C las películas control se solubilizaron completamente y las nanocompuestas en promedio un 45 %. Este comportamiento podría atribuirse a que la adición de AgNPs generaría una estructura más ordenada en la matriz polimérica que le permite mantener su integridad, lo que podría ser indicativo del efecto de refuerzo de nanopartículas. En este sentido, los resultados de solubilidad coincidirían con los de permeabilidad al vapor de agua, previamente descritos.

El contenido de humedad de las películas varió entre 22,6 y 17,0 % p/p (Tabla 1.2). Se puede observar que el agregado de AgNPs en concentraciones mayores a 14,3 ppm produce una disminución en dicho parámetro, mientras que a concentraciones menores no se aprecian diferencias significativas ($p > 0,05$), con respecto al control. En relación con otras matrices de almidón con agregado de agentes antimicrobianos, López y col. (2011) obtuvo valores similares de humedad para películas activas a base de almidón de maíz con sorbato de potasio.

4.3.5. Propiedades mecánicas

El comportamiento mecánico de las películas a base de almidón depende fuertemente de su composición, siendo la incorporación de plastificante y la relación amilosa-amilopectina del almidón utilizado los factores más importantes (Tharanathan, 2003). Así, para películas sin plastificante se registran patrones típicos de materiales quebradizos y frágiles con baja elongación y elevados valores de resistencia a la tracción y ruptura; mientras que las películas plastificadas presentaron las características de un

material dúctil evidenciadas por un aumento en la elongación a la ruptura y una disminución en el esfuerzo (García y col., 2006; López y col., 2011; Sarantópoulos y col., 2002).

La Figura 1.17 muestra las curvas de esfuerzo - deformación de las películas control y nanocompuestas conteniendo 143 ppm de AgNPs. Las muestras control presentaron un comportamiento mecánico correspondiente a un material dúctil y flexible, mientras que la curva de las películas nanocompuestas se asocia a un material más fuerte, lo que indica que las nanopartículas actúan como agente inorgánico de refuerzo de la matriz polimérica.

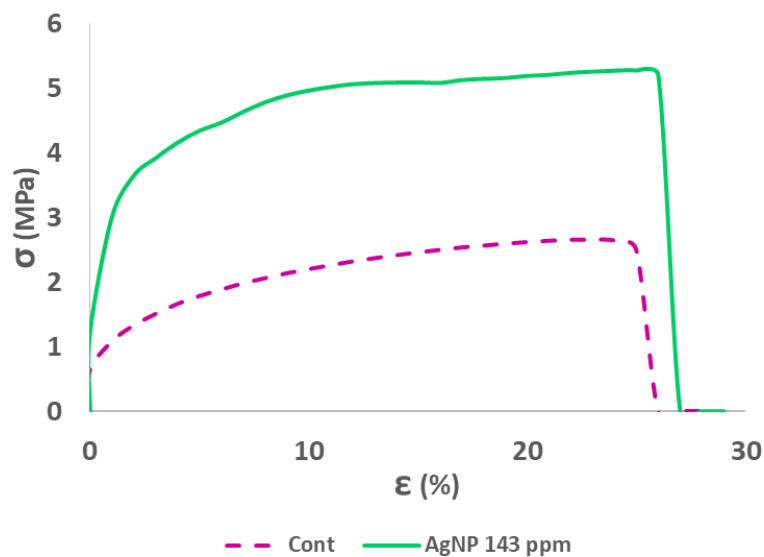


Figura 1.17: Perfil de esfuerzo (σ) - deformación (ϵ) correspondiente a películas a base de almidón de maíz control y nanocompuestas conteniendo AgNPs en concentración de 143 ppm.

Dado que el efecto del plastificante es bien conocido y ha sido ampliamente estudiado en el grupo de trabajo, en el presente trabajo de Tesis se focalizó en el estudio del efecto producido por la incorporación de NPs en las propiedades mecánicas del material.

A partir de los perfiles mecánicos obtenidos se calcularon los parámetros de fuerza de ruptura, esfuerzo, módulo elástico, elongación a la ruptura y trabajo, como se indicó en la Sección 3.4.5.

La Tabla 1.3 muestra que las películas que contienen AgNPs en una concentración de hasta 71,5 ppm exhibieron un refuerzo de la matriz lo que indica que las películas nanocompuestas se comportan como materiales resistentes y tenaces ya que se observa un aumento muy significativo en el esfuerzo ($p < 0,01$), pero la disminución observada en la elongación no resultó ser estadísticamente significativa ($p > 0,05$) manteniéndose prácticamente constante en un 33 %. Rhim y col. (2013) observaron un comportamiento mecánico similar en películas nanocompuestas de agar con AgNPs. La misma tendencia fue informada por Ji, Liu, Zhang, Xiong, y Sun, (2016) trabajando con películas de almidón de maíz con AgNPs (2 - 8 mg/g) obtenidas por reducción química y estabilizadas por cadenas cortas de glucanos.

Tabla 1.3: Parámetros mecánicos de las películas control y nanocompuestas con diferentes concentraciones de AgNPs *in situ*.

Muestra	Elongación a la ruptura (%)	Esfuerzo (MPa)	Módulo elástico (MPa)	Trabajo (J)
Cont	$32,7 \pm 0,8^a$	$2,9 \pm 0,2^a$	$3,7 \pm 0,6^a$	$0,021 \pm 0,001^a$
14,3 ppm	$33,1 \pm 0,07^a$	$3,5 \pm 0,5^{a,b}$	$3,8 \pm 0,6^a$	$0,031 \pm 0,002^b$
28,6 ppm	$32,8 \pm 0,6^a$	$4,1 \pm 0,6^b$	$4,5 \pm 0,3^{a,b}$	$0,036 \pm 0,004^{b,c}$
71,5 ppm	$33,0 \pm 0,6^a$	$4,7 \pm 0,2^b$	$5,4 \pm 0,4^b$	$0,043 \pm 0,005^c$
143 ppm	$32,5 \pm 0,7^a$	$5,8 \pm 0,3^c$	$15,2 \pm 0,3^c$	$0,063 \pm 0,001^d$

Se informan los valores medios \pm la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados correspondientes al trabajo en función de la concentración de AgNPs, se informan en la Tabla 1.3 y están relacionados con la energía de tracción necesaria para romper la probeta (Sarantopoulos y col., 2002). Las películas nanocompuestas presentaron un aumento muy significativo ($p < 0,01$) en este parámetro respecto al control. Este resultado coincide con el aumento del esfuerzo en relación a la deformación observado en el perfil mecánico del material (Figura 1.17).

El módulo elástico, en términos prácticos, es un indicador de la rigidez del film, ya que cuanto mayor sea este parámetro, más rígido será el material. En este sentido, se puede ver que el agregado de nanopartículas de plata a las películas de almidón afectó significativamente ($p < 0,05$) el módulo (Tabla 1.3), lo cual permite sostener la idea del efecto de refuerzo que realizan las NPs en el material desarrollado. Del mismo modo, Kuorwel y col. (2015) destacan que se obtuvieron mejoras en las propiedades mecánicas cuando se incorporaron AgNPs a películas de quitosano con poli-(hidroxialcanoato) (PHA) y poli-(ácido láctico) (PLA). También se ha informado que las películas de polietileno de baja densidad (LDPE) con nanocompuestos de plata disminuyen su elongación a la ruptura (Metak, Nabhani, y Connolly, 2015). Tendencias similares fueron reportadas por Yoksan y Chirachanchai (2010) trabajando en películas compuestas a base de quitosano y almidón con concentraciones más altas de AgNPs (0,15 - 0,29 % p/p).

Mediante la técnica de SEM fue posible observar la topografía superficial, y de los cortes transversales de las películas desarrolladas en este trabajo de Tesis, y sometidas al ensayo de tracción. En la Figura 1.18 se presentan las micrografías de las películas a base de almidón control y conteniendo AgNPs sintetizadas *in situ* en diferentes concentraciones.

La Figura 1.18a muestra la sección transversal de una película de almidón de maíz plastificada con glicerol y sometida a tracción. Se pueden observar grietas o microfisuras en la superficie del material en la dirección en la que se propagó la fractura de la probeta. Esta morfología se corresponde con el comportamiento mecánico observado para este tipo de material, con elongaciones elevadas (alrededor del 32 %) y bajos esfuerzos (cerca de los 2,9 MPa).

Con la incorporación de las nanopartículas se observa el efecto de refuerzo de la matriz, así la Figura 1.18b, correspondiente al material con 28,6 ppm de AgNPs luego del ensayo de tracción, muestra secciones transversales más compactas y una notoria disminución en el número de fisuras; además no se percibe el patrón de alineación de las mismas en la dirección de la fractura de la probeta. Estas observaciones se relacionan con las características mecánicas de estos materiales nanoreforzados, donde con el agregado

de hasta 28,6 ppm de AgNPs se mantenía la elongación aumentando ligeramente tanto el esfuerzo como el módulo elástico del material.

Cuando la concentración de las NPs aumenta hasta 143 ppm se observa que la microestructura del material cambia nuevamente (Figura 1.18c). Las secciones transversales de las películas sometidas a tracción muestran un material compacto con grietas en la superficie, algunas de las cuales se orientan en la dirección de la propagación de la fractura. Los ensayos mecánicos indicaron que, el agregado de las nanopartículas de plata a los materiales permitía mantener la elongación a la ruptura mientras que aumentaba significativamente ($p < 0,05$) tanto el esfuerzo (5,8 MPa) como el módulo elástico y el trabajo asociado a la tracción.

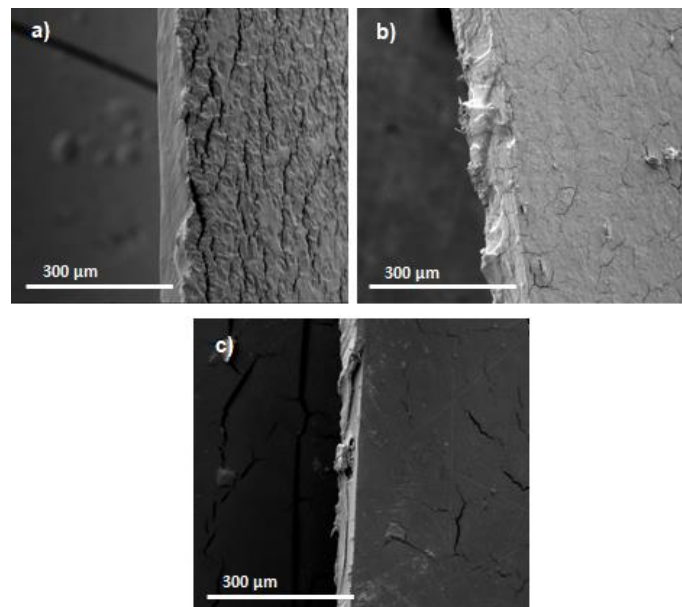


Figura 1.18: Morfología de los cortes transversales de películas de almidón de maíz sometidas a ensayos de tracción: a) control y con agregado de nanopartículas de Ag en diferentes concentraciones: b) 28,6 ppm c) 143 ppm. La magnificación utilizada se indica en las micrografías.

En la Figura 1.19 se muestran a modo de ejemplo los espectros EDX de los cortes transversales de las películas con y sin AgNPs. En las muestras control como era de esperar se detectan los elementos mayoritarios (C, O) de las mismas así como también una señal importante correspondiente al Au utilizado en la metalización de las muestras (Figura 1.19a). Mientras que en las películas con agregado de NPs en una concentración

de 28,6 ppm se detectó una débil señal a aproximadamente 3 keV, lo cual indica la presencia de Ag en las mismas (Fig. 1.19b). Bindhu y Umadevi, (2013) informaron que las AgNPs exhiben un pico de absorción típico a ~ 3 keV debido a su fuerte transición de resonancia de plasmón superficial (SPR). Así, la técnica de EDX permitió evidenciar la presencia de las AgNPs en los materiales desarrollados. Estos resultados concuerdan con los informados por Kanmani y Rhim (2014a).

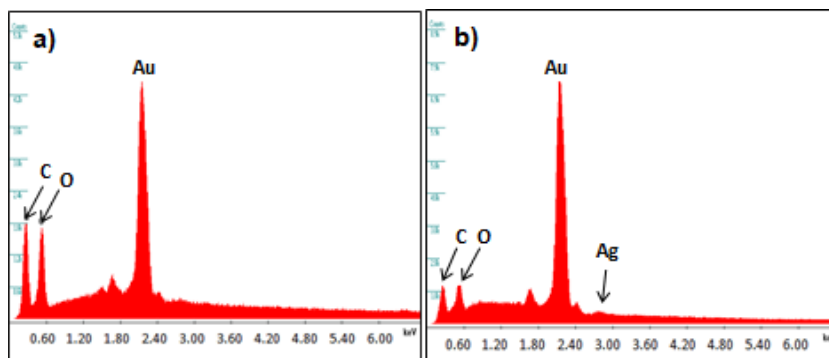


Figura 1.19: Espectros EDX de las películas de almidón de maíz sometidas a ensayos de tracción: a) muestra control b) con incorporación de 28,6 ppm de AgNPs.

4.3.6. Capacidad de termosellado de los materiales

Debido a que el objetivo final de estas películas es obtener un envase activo, se analizó la capacidad de termosellado de los materiales nanocompuestos. El agregado de las AgNPs no modificó la capacidad de termosellado de las películas de almidón.

La Figura 1.20 muestra, a modo de ejemplo, el perfil mecánico obtenido para una de las muestras nanocompuestas con 143 ppm de AgNPs termoselladas. El modo de falla predominante fue por delaminación del termosellado mientras que en las películas control la falla resultó adhesiva.

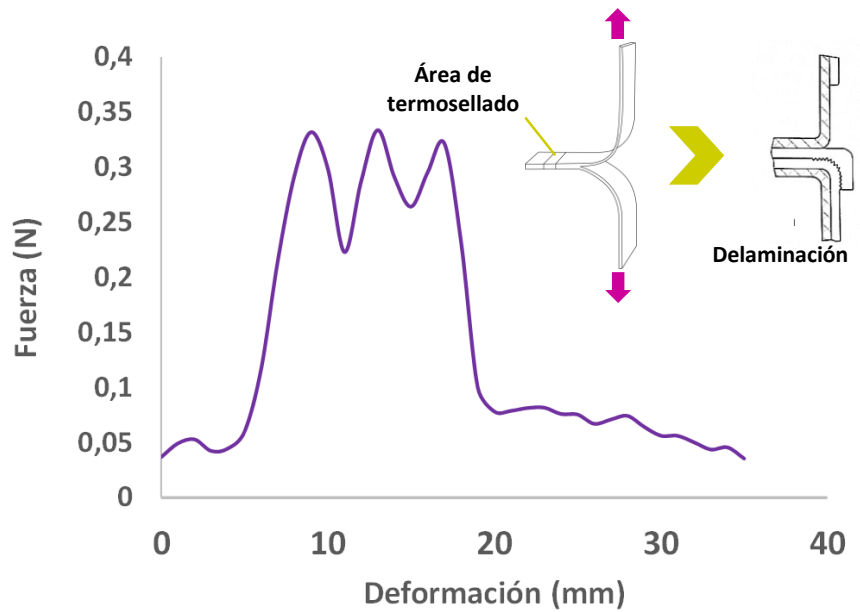


Figura 1.20: Perfil de esfuerzo-deformación de películas nanocompuestas termoselladas conteniendo 143 ppm de AgNPs.

Las películas control exhibieron un valor medio de resistencia de $1,66 \pm 0,2$ MPa con una resistencia máxima de $2,67 \pm 0,4$ MPa. La energía necesaria para romper el termosellado solo se pudo calcular en caso de falla adhesiva, siendo $0,59 \pm 0,13$ J para las películas control. Para las películas nanocompuestas, el valor medio de resistencia obtenido ($1,30 \pm 0,17$ MPa) indica que se logró un cierre resistente. Teniendo en cuenta que la integridad de un envase depende de la calidad de su cierre, se obtiene un buen sellado cuando la interacción molecular entre capas individuales es suficiente para destruir la interfaz, lo que conduce a la formación de una nueva capa homogénea (Cho, Ullsten, Gallstedt, & Hedenqvist, 2007). Del mismo modo, López y col. (2011) estudiaron la capacidad de sellado por calor de las películas de almidón de maíz nativo y observaron que la energía necesaria para romper el termosellado era de $0,224 \pm 0,003$ J, ligeramente más baja que la reportada en este trabajo de Tesis.

4.3.7. Caracterización microestructural de las películas

4.3.7.1. FTIR

El análisis de los espectros ATR-FTIR se realizó con el fin de estudiar las interacciones que ocurren en las películas de almidón de maíz control y nanocompuestas; los resultados se presentan en la Figura 1.21.

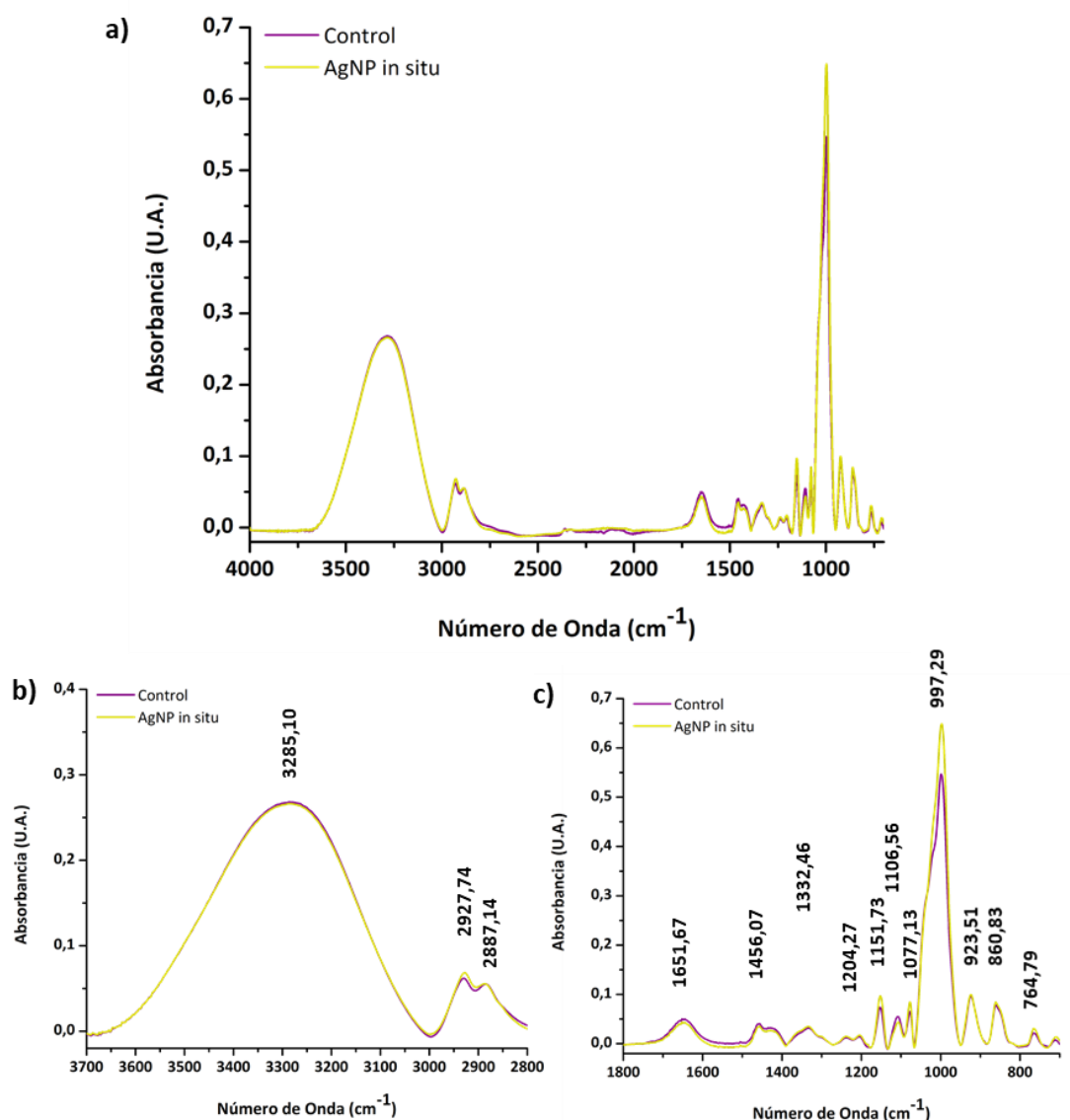


Figura 1.21: a) Espectros ATR-FTIR de películas a base de almidón control y nanocompuestas conteniendo 143 ppm de AgNP *in situ*. Ampliación de la zona del espectro comprendida entre: b) 3700 - 2800 cm⁻¹ y c) 1800 - 700 cm⁻¹.

Como se observa en la Figura 1.21, los espectros de las películas control y con incorporación de AgNP *in situ* son similares, como era de esperar dado que el almidón es el componente mayoritario de la matriz. En la Tabla 1.4 se resume la asignación de las bandas detectadas en los espectros de las películas analizadas. Ambas muestras presentaron una banda ancha alrededor de 3300 cm^{-1} (Fig. 1.21b), la cual corresponde a la vibración del estiramiento de los grupos O–H de polisacáridos y del glicerol que plastifica las películas (Nordin, Othman, Rashid, y Basha, 2020; Versino, 2017). Seguidamente entre $2930 - 2850\text{ cm}^{-1}$ se encuentran las bandas que corresponden a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de los enlaces C–H en los grupos metileno de estas macromoléculas. Como se describe en la Tabla 1.4 la región entre 1700 y 1200 cm^{-1} presenta las vibraciones asociadas a las interacciones de los grupos OH del biopolímero con el agua *libre* y *ligada*. Las películas nanocompuestas presentan una leve disminución en la intensidad de las bandas a 1651 y 1456 cm^{-1} , respecto al control, lo cual indica que los grupos hidroxilo están implicados en la síntesis y estabilización de las AgNP *in situ* en la matriz de almidón. Asimismo, la banda localizada a 1456 cm^{-1} se ha informado que es fuertemente afectada por el contenido de humedad del material (Piermaria et al., 2011), en este sentido los contenidos de humedad de las películas (Tabla 1.2) concuerdan con los resultados de ATR-FTIR.

Entre $1200 - 800\text{ cm}^{-1}$ se encuentran las bandas asociadas a estiramientos del enlace C–O en el almidón y corresponde a la zona de la *huella digital* de los sacáridos y polisacáridos, la deconvolución de las bandas en esta región permitió hacer un análisis más minucioso de las interacciones presentes. La banda situada a 1152 cm^{-1} se asigna a la flexión de los enlaces C–O de los grupos hidroxilos (Enriquez y col., 2013). De acuerdo con (Wang, Li, Copeland, Niu, y Wang, 2015) la región comprendida entre $1200 - 900\text{ cm}^{-1}$ corresponde principalmente a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C–O y C–C, siendo esta región sensible a los cambios en la conformación del almidón (Figura 1.21c). La espectroscopía ATR-FTIR permitió detectar los cambios estructurales del almidón, principalmente en las señales a 1047 , 1022 y 995 cm^{-1} , obtenidas por deconvolución de la banda espectral. Los picos a 1022 cm^{-1} y 1045 cm^{-1} han sido asignados a los modos de plegado del enlace C–O–H del almidón en la región cristalina y amorfa, respectivamente. Además, la señal a 995 cm^{-1} se relaciona con el enlace

punto de hidrógeno intramolecular del grupo hidroxilo del carbono 6 de la glucopiranososa sensible al agua. Las modificaciones de intensidad observadas en este pico en las películas con AgNPs *in situ* sugieren que los OH participan en la síntesis y estabilización de las nanopartículas.

Tabla 1.4: Asignación de bandas ATR-FTIR de películas a base de almidón

<i>Número de onda (cm⁻¹)</i>	<i>Asignación de bandas</i>
3600 - 3000	Estiramiento O–H debido al contenido de agua y Carbohidratos
3610 - 3580	Estiramiento O–H comprometidos parcialmente en interacciones por puentes –H
3460	Estiramiento O–H de agua líquida (enlaces de puente de H moderados o débiles)
3270	Estiramiento O–H de agua líquida (interacciones de puente de H fuertes o extremadamente fuertes)
3000-2800	Estiramiento simétrico y asimétrico C–H
2920	Estiramiento asimétrico C–H de grupos –CH ₂
2872	Estiramiento simétrico C–H de grupos –CH ₂
2850	Estiramiento simétrico C–H de grupos –CH
1750 - 1200	Plegado O-H del agua e interacciones específicas
1690-70	O-H con fuerte interacción con agua ligada
1652	O-H en conglomerados de moléculas de agua con enlaces de puente de H de intensidad moderada y contribuciones de grupos carboxílicos del almidón
1592	O-H de agua “libre” sin enlaces de puente de H
1337	Vibración en el plano de O-H en grupos alcohol
1200-800	Estiramiento –C–O–C y plegado -C-O-H en carbohidratos. Vibraciones de los anillos de piranososa
1164-1139	Vibraciones de los enlaces C-O-C del anillo glucosídico
1080-995	Vibraciones de los enlaces C-O-H del anillo glucosídico
897	Plegado de O-H en enlaces β-glucosídicos entre unidades de glucosa

Adaptado de Versino (2017)

Por otra parte, los valores obtenidos del cociente de la intensidad de las absorbancias a 1045/1022 o 1022/995 proporcionan información sobre el grado de cristalinidad en las películas a base de almidón y se han asociado a la presencia de zonas cristalinas y amorfas, respectivamente. Las relaciones de las absorbancias mencionadas para los picos 1045/1022 que se asocian a la contribución de las zonas cristalinas fueron de 0,604 y 0,538 para las películas control y nanocompuestas respectivamente. Consecuentemente, las relaciones de las absorbancias de los picos 1022/995 fueron de 0,702 y 0,656 para las películas control y con AgNP *in situ*, respectivamente.

4.3.7.2. Difracción de rayos X

Los almidones son compuestos semi-cristalinos y cuentan con la capacidad de difractar los rayos X, permitiendo así, obtener información sobre su estructura (Bello-Pérez y col., 2002). Pueden generar diferentes respuestas frente a la difracción de los rayos X y en general se observan cuatro patrones diferentes que se presentan en la Figura 1.22.

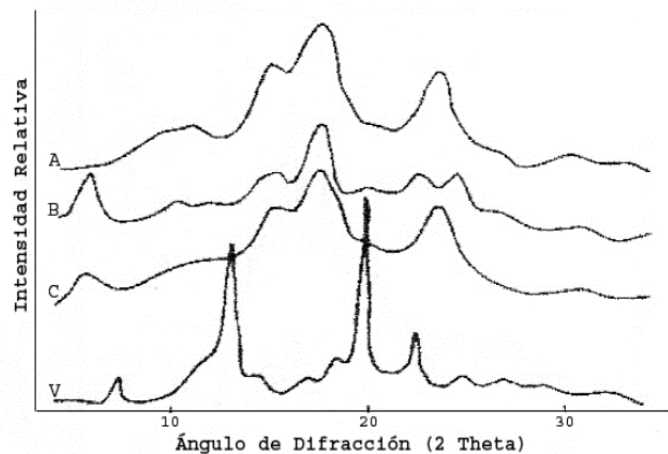


Figura 1.22: Espectros de difracción de rayos X de almidones de diferente origen botánico (A: cereales, B: tubérculos, C: legumbres y V: complejos de inclusión helicoidal de la amilosa cristalina)

Según Zobel (1988) el patrón A es típico de los cereales, el B de los almidones de maíz con alto contenido de amilosa y de los tubérculos, el C de los almidones de legumbres y

corresponde a una estructura intermedia entre A y B; y el patrón V se asocia a complejos de inclusión helicoidal de la amilosa cristalina.

La zona amorfa del gránulo del almidón está formada esencialmente por amilosa, mientras que la región cristalina por cúmulos paralelos de cadenas cortas de amilopectina, la cual también presenta regiones amorfas y altamente cristalinas. Las regiones amorfas están asociadas a los puntos de ramificación de la amilopectina mientras que la región cristalina se debe a los planos formados por los cúmulos y las cadenas lineales en la amilopectina (Rodríguez-Hernández y col., 2001).

En este trabajo de Tesis la técnica de difracción de rayos X se utilizó para analizar la estructura cristalina de las películas desarrolladas. La Figura 1.23 muestra los difractogramas y grados de cristalinidad correspondientes a las películas de almidón nativo (control) y nanocompuesta. Las películas de almidón control mostraron un patrón semi-cristalino con picos centrados en 17,8; 20 y 22,7°. López (2011) señaló que el almidón de maíz presenta un patrón de difracción Tipo A, ubicando los picos de difracción de mayor intensidad en $2\theta = 15, 18$ y 23° mostrando concordancia con los resultados encontrados para las películas control. La pequeña desviación en los picos puede deberse al proceso de elaboración de las películas. Asimismo, la incorporación de AgNPs *in situ* no modificó de manera notable la morfología cristalina de la matriz, ya que no se observan diferencias significativas en la región $2\theta = 10$ a 60° . Tampoco se observaron los picos de difracción característicos para las AgNPs. Mohan y col., (2016), quienes sintetizaron nanopartículas de plata recubiertas con almidón soluble, informaron que las AgNPs presentaron cuatro picos distintivos a $2\theta = 37,6; 43,8; 63,85$ y $77,15^\circ$, los cuales se atribuyen a los planos cristalinos (111), (200) y (311) de la Ag metálica cúbica centrada en las caras (ccc). También mencionaron la existencia de un pico entre 15 y 20° relacionado con la zona amorfa del almidón utilizado como *capping*.

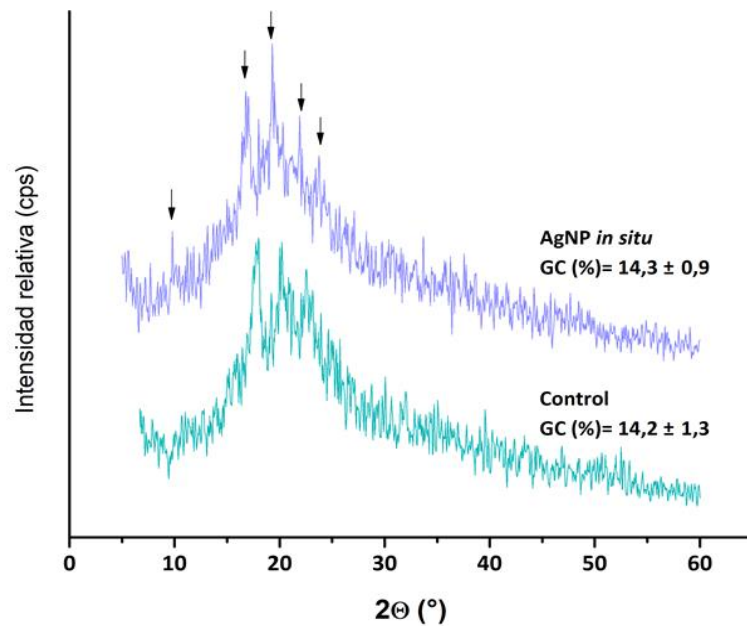


Figura 1.23: Espectros de difracción de rayos X y grados de cristalinidad (GC(%)) de las películas control y nanocompuesta conteniendo AgNPs *in situ* (143ppm).

El hecho de que no se observen diferencias en el grado de cristalinidad de las muestras y que no se distinguen los picos característicos de la plata al estar solapados con la señal del *background* de la matriz de almidón se atribuye a que la concentración de AgNPs *in situ* en la película es muy baja.

Asimismo, mediante MDSC fue posible determinar que tanto las películas control y nanocompuestas conteniendo 143 ppm de AgNPs *in situ* presentaban dos transiciones de segundo orden, lo que es típico de las películas de almidón plastificadas. Diversos autores han reportado que las mezclas de almidón-glicerol son sistemas parcialmente miscibles por lo que se observan dos fases, una rica en almidón y otra rica en glicerol (García y col., 2009; Da Roz y col., 2006; Mathew y Dufresne, 2002; Curvelo y col., 2001). La primera transición, a temperaturas más bajas (T_{g1}), se atribuye a la fase rica en glicerol; mientras que la segunda, por lo general por encima de la temperatura ambiente (T_{g2}), se asocia a la transición de la fase rica en almidón. Así, para las muestras control la T_{g1} se localizó a $-58,6 \pm 1,9$ °C y la T_{g2} se observó a $45,8 \pm 1,6$ °C. La inclusión en la matriz de las AgNPs sintetizadas *in situ* no modificó significativamente la transición

vítrea de la fase ricas en glicerol ($Tg_1 = -55,7 \pm 2,3 \text{ }^\circ\text{C}$) aunque se observó la transición de la fase rica en almidón a menor temperatura ($Tg_2 = 23,4 \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$). Por otra parte, si bien se observó el inicio de la descomposición de la película a temperaturas cercanas a los $151 \text{ }^\circ\text{C}$ este proceso no se pudo cuantificar con precisión debido a la pérdida de la hermeticidad de las cápsulas.

4.4. Evaluación de la capacidad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana está relacionada con aquellos compuestos que reducen la velocidad del crecimiento bacteriano o incluso inhiben el desarrollo de los microorganismos sin ser tóxicos para otros tejidos circundantes (Hajipour y col., 2012; Rather, Sarwara, Das, y Pal, 2018).

Las películas biopoliméricas con actividad antimicrobiana, en numerosas ocasiones, han atraído la atención de la industria alimentaria para el envasado de diferentes productos. Asimismo, se ha informado que la plata en forma de nanopartícula es más efectiva como agente antimicrobiano que la plata masiva (bulk) o los iones plata (Rai, Yadav, y Gade, 2009). Así, mediante la incorporación de AgNPs en la matriz la tasa de deterioro de los alimentos envasados puede reducirse al extenderse su vida útil. En la Figura 1.24 se pueden observar fotografías correspondientes al ensayo de difusión en agar, realizado para determinar la capacidad antimicrobiana de las películas obtenidas. Los resultados revelaron que las películas nanocompuestas presentaron actividad antimicrobiana, por contacto, debajo del área ocupada por la muestra. La ausencia de halo de inhibición sugiere que no se produjo difusión del compuesto activo en el medio, suponiendo una buena retención de las AgNPs en la matriz de la película (Abreu y col., 2015). Este resultado puede estar relacionado a la baja concentración de Ag utilizada para la obtención de las nanopartículas, en comparación con otros autores. Por su parte, (Yoksan & Chirachanchai, 2010) observaron zonas inhibitorias claras de más de 28 mm en películas compuestas de quitosano-almidón utilizando altas concentraciones de nanopartículas de plata, 0,07 - 0,29 % (p/p).

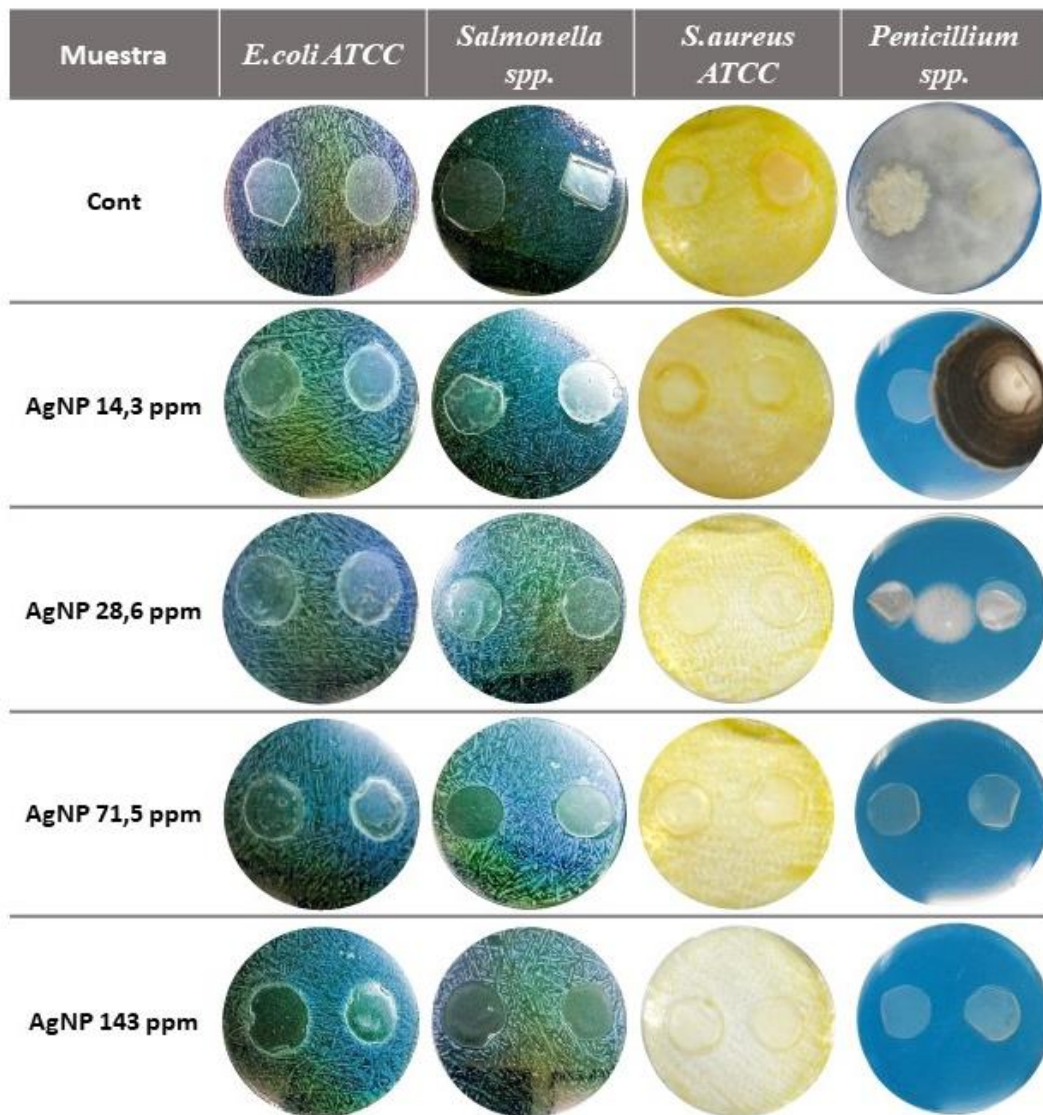


Figura 1.24: Inhibición del desarrollo de *E.coli* ATCC, *Salmonella* spp., *S.aureus* ATCC, y *Penicillium* spp., por películas nanocompuestas conteniendo diferentes concentraciones de AgNPs *in situ* y el control.

La inhibición del crecimiento de *E.coli* y *Salmonella* fue apreciable para películas con concentraciones de AgNPs de 71,5 y 143 ppm, respectivamente. El mismo efecto se observó en el caso de *Penicillium* spp., (Figura 1.24). Con respecto al desarrollo de *S.aureus*, no fue posible observar una zona de inhibición como en el caso de los otros microorganismos ensayados, sólo se evidenció una marcada disminución en el desarrollo del mismo para las placas con películas conteniendo 143 ppm de AgNPs, respecto a las muestras control. Ciertos estudios revelaron que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sobre cepas de *S.aureus* depende del

tamaño de las nanopartículas, siendo efectivas para diámetros menores a 30 nm (Collins y col. 2010). Una posible explicación para el comportamiento observado en *S.aureus*, sería el tamaño obtenido de las nanopartículas (14,2 nm), su polidispersidad (0,32) sumado a que las bacterias Gram-positivas serían menos sensibles a las AgNPs que las Gram-negativas (*E.coli* y *Salmonella*). Mientras que las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa cargada negativamente y una capa delgada de peptidoglicano (~7 - 8 nm), la cual facilita la unión y penetración de las AgNPs, las Gram-positivas carecen de dicha membrana externa y solo cuentan con una capa gruesa y estructurada de peptidoglicano (~ 20 - 80 nm) que limita la unión y penetración de las nanopartículas (Kim y col., 2007; Raghavendra, Jung, Kim, y Seo, 2016; Yoksan y Chirachanchai, 2010).

Si bien hay varios mecanismos propuestos para la acción de las AgNPs sobre diferentes patógenos, incluyendo bacterias, hongos, y virus, ninguno se conoce con exactitud. Por un lado se ha propuesto que el efecto de las AgNPs está asociado con un contacto directo entre las nanopartículas de plata y la pared celular de los microorganismos, seguido de la penetración al citoplasma. Este contacto entre las NPs y la pared podría provocar daños en la membrana, y consecuentemente, la fuga del contenido celular y finalmente su muerte. En este sentido, AgNPs con tamaños menores a los 10 nm serían más tóxicas. Una vez que ingresan al citoplasma, las nanopartículas son capaces de interactuar con proteínas, lípidos y ADN, y en ciertos casos, con enzimas respiratorias generando especies reactivas de oxígeno (ROS) induciendo estrés oxidativo (Dakal, Kumar, Majumdar, & Yadav, 2016). Por otro lado, Sondi y Salopek-Sondi (2004), estudiando la acción de AgNPs sobre *E. Coli* como modelo de microorganismos Gram-negativos, observaron que la acumulación de AgNPs (de 12 nm de diámetro) en la pared celular generaba huecos/orificios, haciendo que la membrana externa perdiera su integridad y se liberen lipopolisacáridos y proteínas de membrana, causando la muerte de las bacterias. Otro de los mecanismos ampliamente estudiado es la liberación de iones plata (Ag^+) por parte de las AgNPs, los cuales pueden reaccionar con los grupos -SH de las enzimas y proteínas ancladas a la pared celular, e interferir con la cadena respiratoria y alterar la pared celular. También se ha visto que en ciertos casos, las AgNPs que han penetrado dentro de la célula pueden liberar Ag^+ , los cuales son los responsables de generar radicales libres y estrés oxidativo. La generación de ROS facilita

la peroxidación lipídica, inhibe la producción de ATP y replicación de ADN (Dakal y col., 2016)

Este ensayo permitió definir que las muestras con una concentración de AgNPs de 143 ppm además de aportar actividad antimicrobiana, presentaban una mayor integridad frente al ataque de microorganismos. Por este motivo, se seleccionó esta concentración de AgNPs para evaluar el efecto del contenido de almidón en las matrices nanocompuestas.

4.5. Efecto del contenido de almidón sobre matrices nanocompuestas conteniendo AgNPs

4.5.1. Síntesis de nanopartículas de plata in situ

Según lo mencionado anteriormente la síntesis de AgNPs se pudo acoplar a la preparación de suspensiones filmogénicas de almidón de maíz mediante una reacción redox, utilizando reactivos considerados GRAS, no tóxicos.

Se evaluó el efecto en la síntesis de AgNPs del contenido de almidón en la suspensión filmogénica (1, 3 y 5 %). En todos los casos se obtuvieron los plasmones de resonancia superficial (SPR) característicos que permiten evidenciar la formación de AgNPs, entre los 420 - 445 nm (Kerker, 1985; Ortega y col., 2017; Slistan-Grijalva y col., 2005). Aunque, tanto las concentraciones de la sal de plata (500 μ M, a fin de evidenciar mejor los efectos) como del agente reductor permanecieron constantes en todos los casos, se observó una mayor absorbancia para las muestras con 3 y 5 % de almidón, pero sin diferencias sustanciales entre ambos. Esto también se evidenció mediante la observación visual de las muestras sintetizadas como se puede ver en la Figura 1.25. Como se mencionó anteriormente, el almidón no solo constituye el agente formador de la matriz polimérica, sino que también actúa como agente de *capping* ya que participa estabilizando las nanopartículas sintetizadas.

El análisis espectral de las muestras reveló un corrimiento del espectro hacia el rojo, y la presencia de un “hombro” a longitudes de onda inferiores al plasmón principal conforme aumenta el contenido de almidón (Fig. 1.25) lo cual puede atribuirse a la

formación de una capa ultrafina de óxido de plata (Ag_2O) en la superficie de las AgNPs (Santillán, Scaffardi, y Schinca, 2011; Yin y col., 2002).

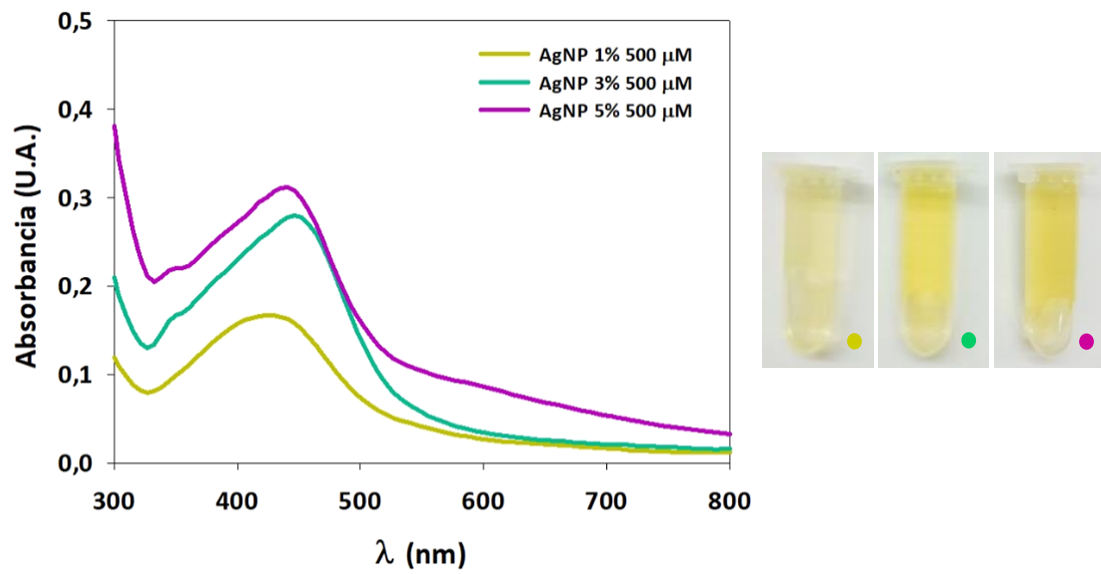


Figura 1.25: Espectros de absorción UV-visible y fotografía de las suspensiones filmogénicas conteniendo las AgNPs estabilizadas con diferentes concentraciones de almidón de maíz.

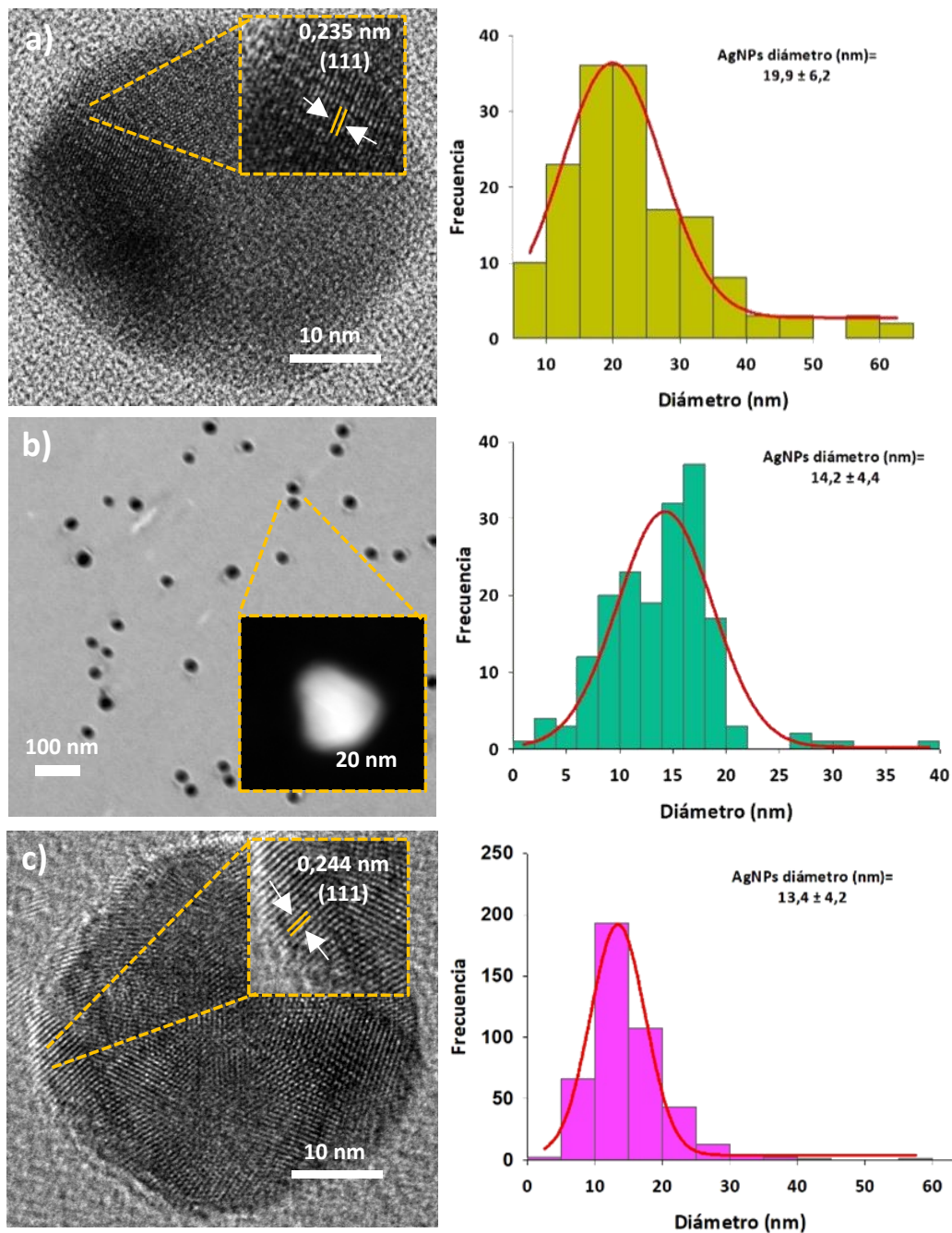


Figura 1.26: Micrografías de HR-TEM y el histograma correspondiente para las AgNPs 143 ppm estabilizadas con a) 1%, b) 3% y c) 5% de almidón en la suspensión filmogénica. Para las AgNPs 3% se incluye una imagen correspondiente al modo S-TEM.

Las micrografías obtenidas mediante la técnica de HR-TEM indican que, independientemente del contenido de almidón utilizado, se obtuvieron nanopartículas con morfología esférica y distribución uniforme dentro de la suspensión. También se observó una ligera disminución del tamaño de las AgNPs conforme aumenta el contenido de almidón, pero sin diferencias significativas, registrándose diámetros de

19,9 ± 6,2 nm para las AgNPs sintetizadas con 1 % de almidón; 14,2 ± 4,4 nm con 3 % de almidón y 13,4 ± 4,2 nm con 5 % de almidón (en la suspensión filmogénica) (Figura 1.26a, b y c). El *capping* de las nanopartículas de plata fue más eficiente al aumentar la concentración de almidón, lo que condujo a NPs más pequeñas. En este sentido, la presencia de un gran número de cadenas poliméricas que componen el almidón (mayoritariamente amilosa), disminuye el volumen relativo disponible para el movimiento de los iones de Ag⁺ desfavoreciendo el desarrollo de NPs de mayor tamaño (Raghavendra, Jung, Kim, y col., 2016; Sibiya, Xaba, y Moloto, 2016).

Mediante esta técnica, además, fue posible determinar las separaciones entre los planos cristalinos para las muestras de AgNPs con almidón 1 % y 5 %, siendo 0,235 y 0,244 nm respectivamente. Los valores correspondientes a las muestras nanocompuestas en almidón al 3% presentó valores similares al 5%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gao y col. (2011) y, además, con el valor estándar para la separación d (111) de los cristales de Ag (0,2355 nm) según el Comité Conjunto sobre Normas de Difracción de Polvos (JCPDS no. 04-0784, Joint Committee on Powder Diffraction Standards, Diffraction Data File: JCPDS International Center for Diffraction Data. Swarthmore PA. 1991). La presencia de plata en las nanopartículas se pudo confirmar utilizando el modo S-TEM (detector EDX) del microscopio, visualizándose como puntos blancos brillantes (Fig. 1.26b).

Mediante la caracterización del potencial superficial de las nanopartículas, se pudo observar una variación en el valor de ζ para las suspensiones nanocompuestas, siendo -34,9; -12,7 y -6,3 mV para las muestras de almidón de 1, 3 y 5 %, respectivamente. Este hecho podría deberse a la presencia de una delgada capa de óxido de plata (Ag₂O) en la superficie de las NPs, la cual proporciona una carga positiva, que es compensada por el oxígeno cargado negativamente presente en las cadenas de almidón. Esta hipótesis concuerda con lo propuesto por otros autores (Santillán y col., 2011; Yin y col., 2002). Asimismo, los valores de potencial Z obtenidos para almidón al 1 % fueron similares a los reportados por Arce y col. (2017) para nanopartículas de plata sintetizadas por el método de ablación con láser empleando también una suspensión de almidón 1 % como agente de *capping*. Esto refuerza la hipótesis que se había propuesto en el análisis de

los espectros de absorbancia de las AgNPs, sobre la posible formación de una delgada capa de óxido de plata y que permitió explicar, además, los resultados de capacidad antimicrobiana, en sintonía con uno de los mecanismos propuestos.

4.5.2. Caracterización reológica de las suspensiones filmogénicas.

Independientemente de la incorporación de nanopartículas de plata, las suspensiones filmogénicas con almidón al 1 % exhibieron un comportamiento Newtoniano con una viscosidad de 3 mPas, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las formulaciones control y nanocompuestas (Tabla 1.5).

Tabla 1.5: Ajuste de los parámetros reológicos, obtenidos de los datos experimentales, al modelo Newtoniano y de Ostwald de Waele.

Concentración de almidón en las películas (%)	Modelo Newtoniano			
	Viscosidad (mPa)		r^2	
1_143 ppm	3,07 ± 0,08 ^a		0,9294	
1_control	3,06 ± 0,20 ^a		0,9031	
	Modelo Ostwald de Waele			
	Viscosidad aparente a 500 s ⁻¹ (mPa)	K (Pa s ⁿ)	n	r^2
3_143 ppm	40,1 ± 2,7 ^b	0,83 ± 0,6 ^b	0,510 ± 0,02 ^c	0,9998
3_control	24,1 ± 0,9 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,01 ^d	0,9998
5_143 ppm	85,5 ± 5,3 ^d	3,0 ± 0,2 ^d	0,425 ± 0,003 ^a	0,9996
5_control	57,5 ± 0,2 ^c	1,65 ± 0,01 ^c	0,458 ± 0,002 ^b	0,9997

Se informan los valores medios ± la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La Figura 1.27 muestra las curvas de flujo correspondientes a las suspensiones filmogénicas con 3 y 5 % de almidón para las formulaciones control y nanocompuestas, en la cual se puede observar que se ajustan al comportamiento pseudoplástico ($n < 1$). Los datos experimentales se adecúan satisfactoriamente al modelo de Ostwald de Waele ($r^2 > 0,9995$, Tabla 1.5). Como se esperaba, el incremento del contenido de almidón en la formulación aumentó tanto la viscosidad aparente como el índice de consistencia, mientras que disminuyó el índice de comportamiento del flujo debido al

aumento en el contenido de sólidos. Es así que, las suspensiones filmogénicas nanocompuestas exhibieron una viscosidad aparente significativamente ($p < 0,05$) mayor que las de los controles. Estos resultados coinciden con los publicados por Romero-Bastida y col. (2018) quienes estudiaron el comportamiento reológico de suspensiones nanocompuestas a base de montmorillonita y almidón de maíz nativo con alto contenido de amilosa.

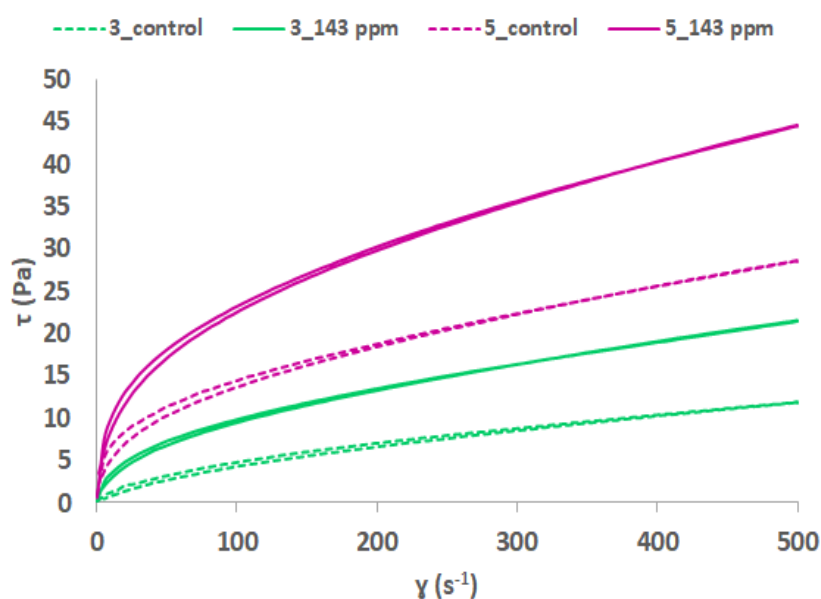


Figura 1.27: Curvas de flujo rotacional correspondiente a las suspensiones filmogénicas control y nanocompuestas con 3 y 5 % de almidón conteniendo AgNPs *in situ* (143ppm).

Asimismo, estos resultados permiten reforzar la idea de que las AgNPs estarían recubiertas por cadenas de almidón, las cuales podrían actuar como agentes de refuerzo en la red de almidón desarrollada, promoviendo así el aumento de la viscosidad (Ortega y col., 2019).

4.5.3. Películas nanocompuestas

4.5.3.1. Cinética de secado

Durante el secado, todos los agentes volátiles se evaporan progresivamente aumentando la eliminación del solvente y, en consecuencia, se incrementa el contenido

de materia seca de las películas. En este sentido se registró una disminución gradual en la humedad durante la formación de las películas. Las suspensiones filmogénicas conteniendo 1 % de almidón de maíz, tanto control como nanocompuestas, se secaron más rápidamente que las muestras conteniendo 5 % de almidón. Esto se explica considerando que, hay una cantidad considerable de agua que se encuentra disponible para evaporar, cuando disminuye el porcentaje de almidón (Figura 1.28). En general, cuanto mayor es la viscosidad de la suspensión filmogénica, mayor es el tiempo necesario para que se complete el secado. Cabe mencionar que más allá de los 300 min de secado los contenidos de humedad de las muestras alcanzaron los valores de equilibrio.

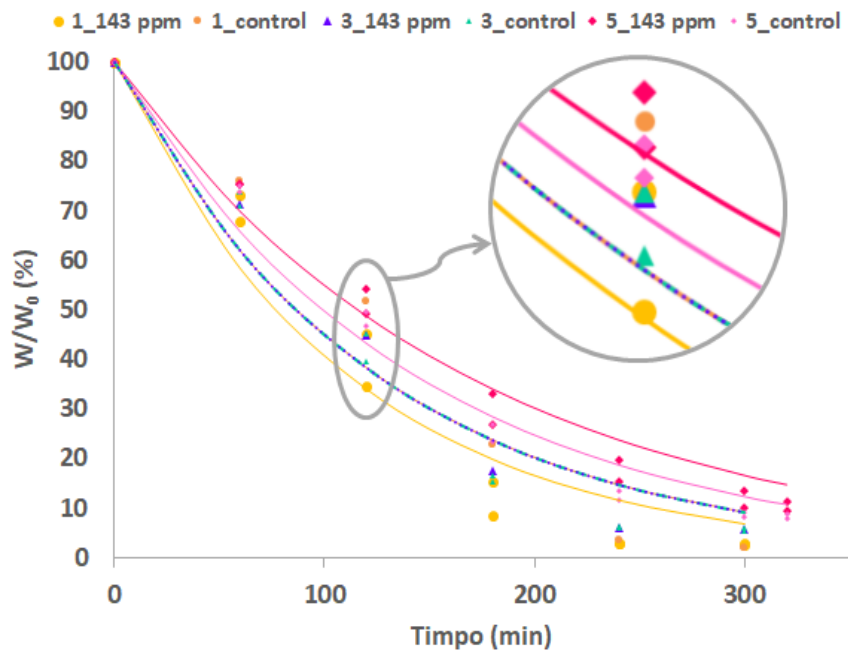


Figura 1.28: Curvas que representan la cinética de secado para las suspensiones filmogénicas control y nanocompuestas con 1, 3 y 5% de almidón de maíz.

Para todas las formulaciones ensayadas, se obtuvieron películas homogéneas que pudieron ser retiradas fácilmente de las placas acrílicas que las contenían. Además, los espesores de los materiales aumentaron con la concentración de almidón principalmente, debido al aumento en el contenido de sólido. Otros autores informaron resultados similares (Luchese, Spada, y Tessaro, 2017; Riar, 2016). Por otro lado, la

posible formación de aglomerados de las AgNPs, podría estar relacionada con el aumento del espesor en las películas nanocompuestas en comparación con las muestras control, especialmente para los films obtenidos con 3 % y 5 % de almidón (Tabla 1.6) (Ortega y col., 2019).

4.5.3.2. Propiedades ópticas

Visualmente, las películas nanocompuestas con 1 % de almidón presentan un color naranja pálido. Esto puede deberse a que hay un menor efecto de *capping* del almidón sobre las AgNPs. Asimismo, como se mencionó en la Sección 3.4.2, la diferencia en las propiedades ópticas entre las películas control y nanocompuestas podrían atribuirse a la reacción de pardeamiento químico de la maltosa presente en la matriz. El parámetro de luminosidad (L^*) fue ligeramente modificado por la concentración de almidón y la presencia de nanopartículas de plata. Por otro lado, la diferencia de color (ΔE), como se esperaba, también se vio afectada obteniéndose los valores más altos para muestras nanocompuestas con menor contenido de almidón y lo contrario se observó para las muestras control (Tabla 1.6).

En la Tabla 1.6 también se pueden observar los valores de transparencia para los materiales obtenidos, los cuales disminuyeron notablemente con el aumento en el contenido de almidón y la adición de AgNPs.

La capacidad de barrera de las películas frente a la radiación UV, se vio fuertemente afectada por el contenido de almidón en la matriz, pero la presencia de nanopartículas de plata no presentó ($p > 0,05$) un impacto significativo en este parámetro (Tabla 1.6).

Tabla 1.6: Propiedades ópticas de las películas control y nanocompuestas obtenidas con diferentes concentraciones de almidón.

Muestra	Espesor (μm)	Cap. de barrera UV-vis	Transparencia	L*	ΔE
1_143 ppm	34,95 \pm 0,07 ^a	255,7 \pm 22,8 ^a	11,4 \pm 0,5 ^e	95,1 \pm 0,6 ^d	3,6 \pm 0,7 ^d
1_control	35,8 \pm 2,5 ^a	274,4 \pm 17,4 ^a	13,4 \pm 0,2 ^f	94,8 \pm 0,1 ^{c,d}	0,52 \pm 0,04 ^a
3_143 ppm	97,3 \pm 1,2 ^c	314,1 \pm 14,7 ^b	4,5 \pm 0,3 ^c	94,7 \pm 0,7 ^c	2,8 \pm 0,3 ^c
3_control	87,9 \pm 5,0 ^b	364,0 \pm 25,4 ^c	6,4 \pm 0,1 ^d	93,2 \pm 0,3 ^a	1,8 \pm 0,2 ^b
5_143 ppm	166,6 \pm 1,3 ^e	375,7 \pm 46,1 ^c	3,0 \pm 0,5 ^b	95,0 \pm 0,4 ^{c,d}	2,6 \pm 0,4 ^c
5_control	141,3 \pm 8,9 ^d	387,5 \pm 10,2 ^c	3,6 \pm 0,2 ^a	93,8 \pm 0,3 ^b	1,7 \pm 0,3 ^b

Se informan los valores medios \pm la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.5.3.3. Propiedades mecánicas de las películas

En la Figura 1.29a se muestra un perfil mecánico representativo obtenido para las películas desarrolladas con diferentes concentraciones de almidón de maíz nativo. En general, los perfiles mecánicos corresponden al de un material dúctil, donde se puede observar tanto el efecto del contenido de almidón como de la incorporación de AgNPs. Cabe señalar que en las películas preparadas con 1 % de almidón, aunque la concentración del polímero es baja, es suficiente para la formación de la película. Estos resultados se contraponen con lo explicitado por Liu y Han (2005), y previamente mencionado en este Capítulo, quienes indicaron que se requería una concentración crítica del 3% para la obtención de películas de almidón de maíz.

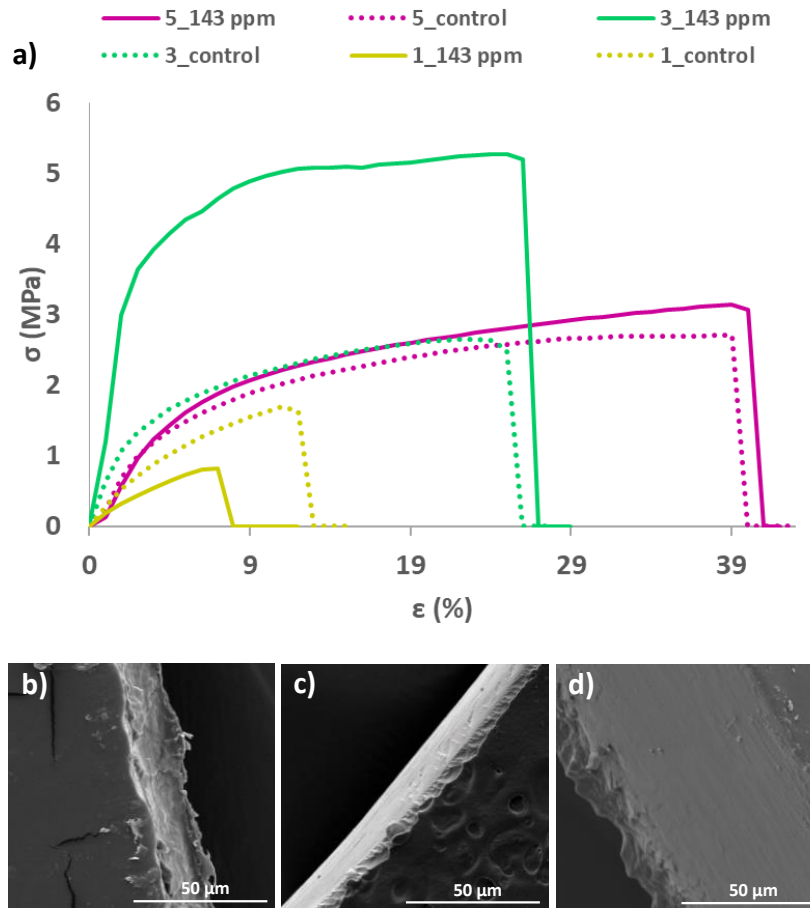


Figura 1.29: a) Curvas de esfuerzo (σ) - deformación (ϵ) para películas control y nanocompuestas con AgNPs *in situ* (143ppm) formuladas con almidón al 1, 3 y 5%, e imágenes SEM de las secciones transversales de las películas nanocompuestas: b) 1_143 ppm, c) 3_143 ppm y d) 5_143 ppm.

La elongación para las películas nanocompuestas con 1 % de almidón, difiere muy significativamente ($p < 0,01$) de su respectivo control. Debido al bajo contenido de almidón, se desarrolla una matriz débil y, además, en este caso, la adición de AgNPs interfiere con las interacciones de las cadenas de almidón que conducen a una película más flexible (Ortega y col., 2019). Las AgNPs perturban la estructura de la matriz, generando defectos que afectan las propiedades mecánicas del material obtenido como se observa en el perfil mecánico (Figura 1.29a).

El aumento de la concentración de almidón de maíz hasta un 3 % permite el desarrollo de películas con mejores propiedades mecánicas. Por lo tanto, la elongación, la resistencia a la tracción y el módulo elástico mejoraron significativamente ($p < 0,05$) en

comparación con las películas formuladas con 1 % de almidón (Tabla 1.7). Luchese y col. (2017) desarrollaron películas de almidón de maíz y mandioca y observaron también un aumento en la elongación cuando la concentración de almidón varió de 2 a 4 %. Sin embargo, en el presente trabajo de Tesis no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en los parámetros mecánicos analizados cuando la concentración de almidón fue de 5 % (Tabla 1.7).

La adición de nanopartículas de plata a las películas de almidón al 3 % reforzó las matrices, lo cual se evidenció por el incremento del módulo elástico de las películas nanocompuestas en comparación con las películas control, como ya se mencionó.

Se demostró el efecto de refuerzo que ejercen las AgNPs en una concentración de 143 ppm sobre la matriz polimérica, indicando el desarrollo de una estructura más resistente (Ortega y col., 2017). La tenacidad de los materiales, asociada a la energía requerida para romper la película, siguió una tendencia similar a la del módulo elástico (Tabla 1.7). Sin embargo, considerando que en las películas con 5 % de almidón probablemente se forma una estructura más densa y fuerte, la inclusión de AgNPs no produjo un efecto significativo en las propiedades mecánicas ya que la matriz en sí misma es fuerte y no hay evidencia de refuerzo adicional.

Por consiguiente, los resultados obtenidos indican que las películas conteniendo un 3 % de almidón presentan una relación óptima entre la estructura de la matriz desarrollada y el efecto de refuerzo de AgNPs, lo cual se evidencia en los valores obtenidos de resistencia a la tracción, tenacidad y módulo elástico.

Tabla 1.7: Contenido de humedad y propiedades mecánicas de las muestras control y nanocompuestas con AgNPs *in situ* (143ppm) obtenidas con diferente contenido de almidón.

Muestra	Humedad (%)	Elongación (%)	Esfuerzo (MPa)	Módulo elástico (MPa)	Trabajo (J)
1_143 ppm	36,2 ± 2,7 ^c	17,2 ± 3,9 ^b	1,7 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,7 ^b	0,010 ± 0,005 ^b
1_control	36,6 ± 0,3 ^c	13,33 ± 0,02 ^a	1,6 ± 0,3 ^f	1,7 ± 0,4 ^a	0,0020 ± 0,0004 ^a
3_143 ppm	31,5 ± 5,5 ^{b,c}	32,5 ± 0,7 ^c	5,8 ± 0,3 ^d	15,2 ± 1,3 ^e	0,063 ± 0,001 ^d
3_control	24,9 ± 3,5 ^b	32,7 ± 0,8 ^c	2,9 ± 0,2 ^c	3,7 ± 0,6 ^c	0,021 ± 0,001 ^c
5_143 ppm	33,3 ± 5,3 ^{b,c}	61,9 ± 6,2 ^d	2,6 ± 0,5 ^b	5,5 ± 0,7 ^d	0,27 ± 0,05 ^f
5_control	15,8 ± 2,6 ^a	66,9 ± 3,5 ^e	2,7 ± 0,2 ^{b,c}	3,8 ± 0,5 ^c	0,080 ± 0,005 ^e

Se informan los valores medios ± la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.5.3.4. Caracterización microestructural de las películas

En las Figuras 1.29b, c y d se muestran las micrografías de SEM de la topografía superficial y de las secciones transversales para las películas nanocompuestas formuladas con 1, 3 y 5 % de almidón, respectivamente. Independientemente de la concentración de almidón utilizada, las películas presentaron superficies homogéneas, lisas y uniformes, sin grietas ni poros y estructuras compactas. Asimismo, no se detectó migración de glicerol desde la matriz (incluso en las muestras con 1 % de almidón), lo que sugiere una buena afinidad de la matriz nanocompuesta con el plastificante.

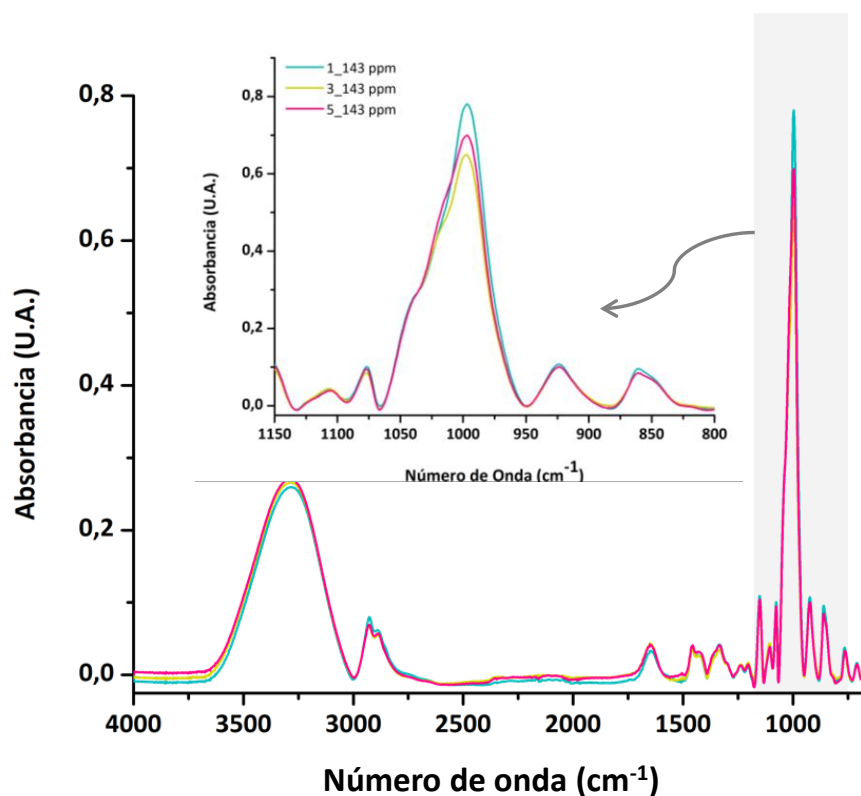


Figura 1.30: Espectros ATR-FTIR para las películas de almidón nanocompuestas con 143 ppm de AgNP *in situ* y concentraciones de almidón, 1, 3 y 5 %. Inserto en la imagen se observa una magnificación de la región de la huella de los carbohidratos (1150 – 800 cm⁻¹).

Al observar los espectros ATR-FTIR para las películas con distintas concentraciones de almidón y conteniendo 143 ppm de AgNP *in situ* (Figura 1.30) no se encuentran diferencias importantes respecto a los picos obtenidos para las películas a base de almidón (Tabla 1.4), excepto para la región de la *huella digital* de los carbohidratos (principalmente para las bandas correspondiente a 1022 y 995 cm⁻¹), en la cual se evidencian las vibraciones de los enlaces C–O–C y C–O–H del anillo glucosídico, como ya se mencionó. La relación entre las intensidades de las absorbancias 1045/1022 o 1022/995 se calculó arrojando los resultados presentados en la Tabla 1.8. Como puede apreciarse, no es posible obtener conclusiones respecto al carácter cristalino o amorfo de las películas nanocompuestas con diferentes concentraciones de almidón debido a la inconsistencia en los valores alcanzados. Así, para estimar las contribuciones amorfas y cristalinas del material sería necesario realizar el análisis por difracción de rayos X de cada una de las muestras nanocompuestas incluyendo sus respectivos controles.

Tabla 1.8: Relación entre las intensidades de las absorbancias de los picos a 1045, 1022 y 995 cm^{-1} para las películas nanocompuestas con 1, 3 y 5 % de almidón.

Muestra	Relación de absorbancias de los picos 1045/1022	Relación de absorbancias de los picos 1022/995
1_143 ppm	0,55484	0,54115
3_143 ppm	0,53082	0,65623
5_143 ppm	0,50200	0,64503

Con respecto a la banda localizada a 995 cm^{-1} que, como se mencionó anteriormente es indicativa de la participación de los grupos OH en la estabilización de las nanopartículas sintetizadas, las modificaciones observadas confirman esta interacción si bien los resultados presentados no siguen un patrón de comportamiento en función de la concentración de almidón.

4.5.3.4. Propiedades de las películas nanocompuestas relacionadas con el agua

En esta ocasión además de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) se calculó la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) dividiendo la pendiente de la regresión lineal de la ganancia de peso vs tiempo, por el área expuesta de la película en la celda de permeación.

Los valores obtenidos de WVTR fueron similares para todas las películas control (Figura 1.31a), y la adición de nanopartículas solo afectó esta propiedad en el caso de películas de almidón al 1 %. Este resultado puede atribuirse a la interferencia de las nanopartículas en las interacciones entre las cadenas de almidón y se correlaciona con los parámetros mecánicos informados anteriormente. Los valores de WVTR obtenidos estuvieron dentro del rango de los reportados por Katerinopoulou, Giannakas, y Barkoula (2018) para películas compuestas de almidón de maíz-PVOH conteniendo nanoarcilla.

Cuando se calculó la WVP a partir de la WVTR, se evidenció el efecto directo del espesor de la película (Figura 1.31b). Los valores de permeabilidad al vapor de agua tendieron a aumentar con el contenido de almidón en la matriz hasta un 3 %, ya que no se

detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para las películas con 3 y 5 % de almidón. Además, estos resultados también coincidieron con las propiedades mecánicas de la película (Tabla 1.7) así como con las observaciones al SEM (Figura 1.29). La adición de nanopartículas condujo a un aumento en la tortuosidad de la matriz lo que disminuye la difusión de las moléculas de agua a través de la estructura de material, solo para películas de almidón de 3 y 5 %. En este sentido, Sarwar, Niazi, Jahan, Ahmad, y Hussain (2018) señalaron que la WVP disminuye con la incorporación de AgNPs, atribuyendo los resultados obtenidos también al aumento en la tortuosidad.

La concentración óptima de almidón en las formulaciones de película nanocompuestas fue del 3 %, ya que estas exhibieron las mejores propiedades de barrera de vapor de agua.

Kanmani y Rhim (2014b) trabajando con películas de gelatina destacaron que la incorporación de nanopartículas de plata reducía la interacción entre las cadenas de polímeros aumentando la disponibilidad de grupos hidroxilo libres para absorber agua. En este sentido, los valores del contenido de humedad en las películas nanocompuestas coinciden con esta afirmación para formulaciones con almidón de maíz al 3 y 5 % (Tabla 1.7).

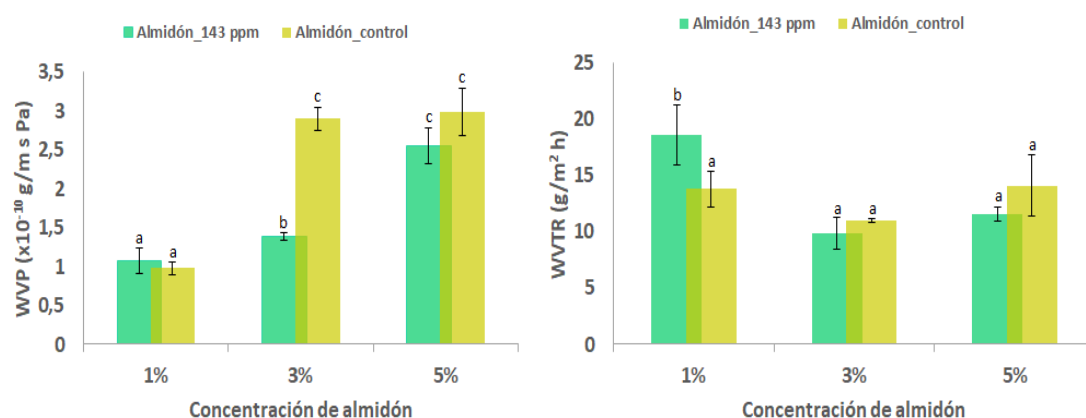


Figura 1.31: a) Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y b) tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) de las películas control y con AgNP *in situ* (143 ppm) desarrolladas con diferentes concentraciones de almidón de maíz.

Con respecto a la solubilidad de las películas, a 100 °C la desintegración fue mayor que a 25 °C. Para las muestras control, a mayor contenido de almidón en las películas, menor es la solubilidad, independientemente de la temperatura del ensayo (Fig. 1.32a y b). En general, se alcanzó una solubilidad del 30 - 40 % para todas las muestras nanocompuestas, en ambas condiciones analizadas. Este resultado puede explicarse considerando que la presencia de AgNPs podría facilitar la desintegración de la matriz hidrofílica durante el ensayo.

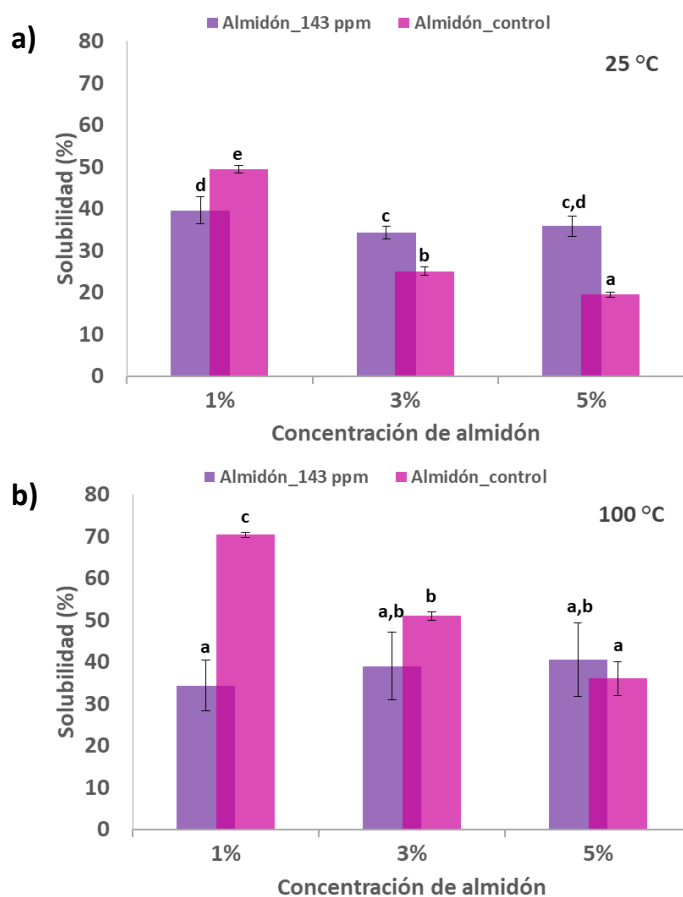


Figura 1.32: Solubilidad en agua a: a) 25 °C y b) 100 °C, de las películas nanocompuestas con AgNP *in situ* (143 ppm) y control formuladas con distintas concentraciones de almidón.

4.5.4. Capacidad antimicrobiana de las películas nanocompuestas

Los resultados obtenidos para las películas con 1 y 5 % de almidón, control y conteniendo 143 ppm de AgNPs *in situ*, se muestran en la Figura 1.33. Como era de esperar, las películas control no mostraron efecto inhibitorio para los microorganismos ensayados.

Las películas nanocompuestas formuladas con 1 % de almidón mostraron buenas propiedades antimicrobianas, inhibiendo por contacto las cepas de *E.coli* y *Salmonella spp.*, mientras que presentaron un halo de inhibición de 2 mm para *S.aureus*. En el caso de las películas desarrolladas con 5% de almidón, aunque exhibieron inhibición por contacto sobre las cepas probadas, la evaluación fue difícil ya que las películas tendieron a enrollarse una vez depositadas en las placas conteniendo el medio de cultivo (Figura 1.33).

Las diferencias observadas pueden explicarse teniendo en cuenta las características estructurales de las películas obtenidas (en relación con el contenido de almidón), así como el nivel de exposición de las AgNPs incluidas en la matriz. Las películas formuladas con 1 % de almidón, que condujeron al desarrollo de una matriz débil y menos estructurada, permitieron una mayor exposición de las nanopartículas (en comparación con las películas que contienen 3 % y 5 % de almidón), siendo más evidente el efecto de inhibición en estas muestras (Figura 1.33). En cuanto a la inhibición de bacterias Gram positivas, tanto Ji y col. (2016) como Panácek y col. (2006) atribuyeron el efecto observado al tamaño de las nanopartículas manifestando que diámetros de entre 5 y 25 nm pueden alcanzar más fácilmente el contenido nuclear al alterar la membrana celular y aumentar su permeabilidad y función, lo cual concluye con la destrucción bacteriana.

Algunos autores (Dakal y col., 2016; Hamouda y Baker, 2000) sugieren que la acción de la actividad antimicrobiana se da por interacción electroestática entre la carga positiva de las AgNPs y la carga negativa de las células bacterianas. A pesar de que las AgNPs estabilizadas en la matriz de almidón tuvieron una carga superficial negativa, como demostraron los valores obtenidos de potencial Z, pueden interactuar con algunos componentes de la membrana causando cambios estructurales como la formación de huecos/orificios, su degradación y finalmente la muerte celular (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Kim y col. (2007), obtuvieron resultados similares.

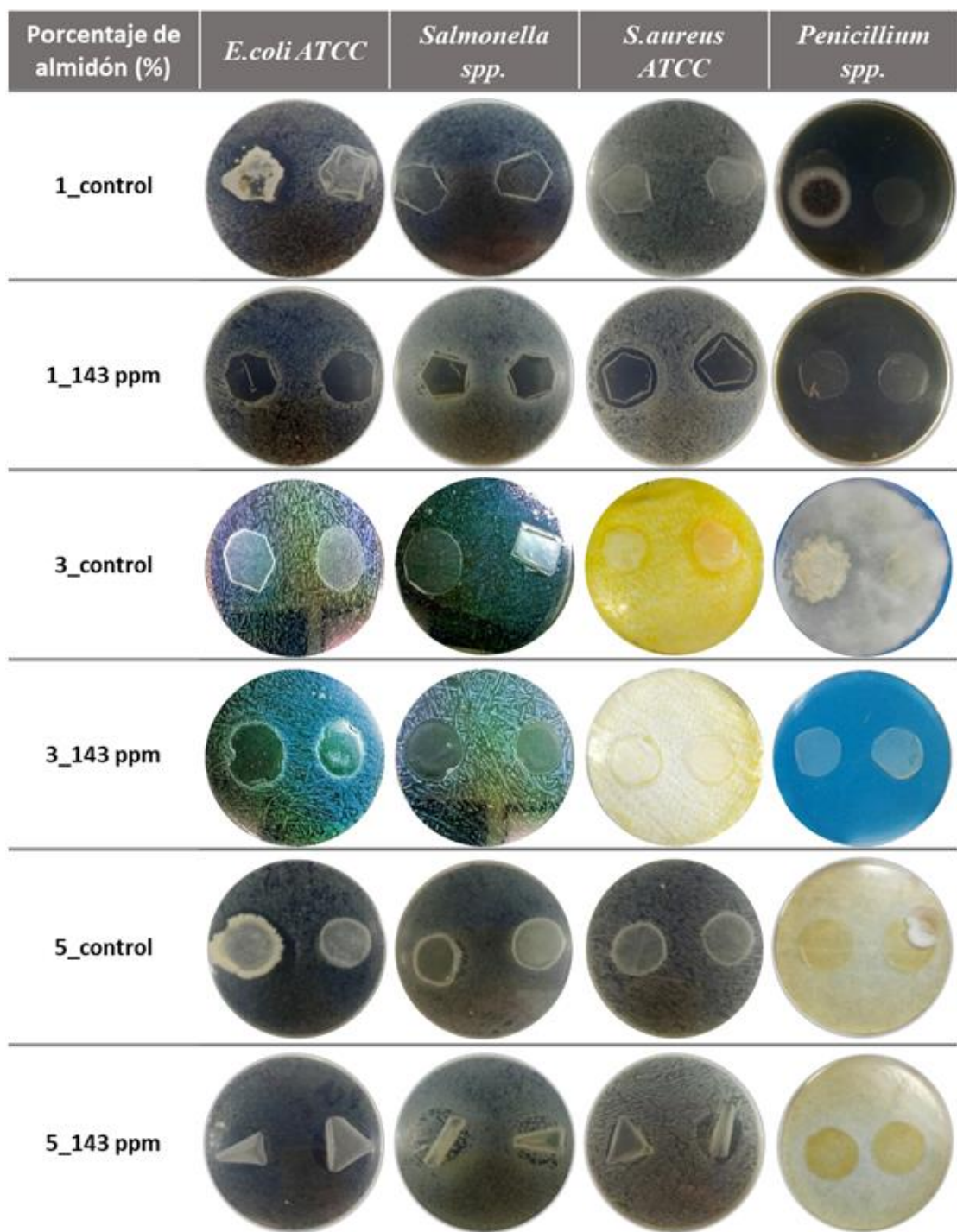


Figura 1.33: Actividad antimicrobiana de los films desarrollados, testeados sobre cepas de *E.coli* ATCC, *Salmonella* spp., *S.aureus* ATCC y *Penicillium* spp.. Las fotografías correspondientes al contenido de almidón de 3% p/v son las presentadas en la Figura 1.24.

El análisis sobre la inhibición de *Penicillium* spp. en las películas con un 3 % de almidón demostró que la incorporación de 14,3 ppm de AgNPs disminuyó el crecimiento del hongo, mientras que la inhibición fue completa para las concentraciones mayores a

71,5 ppm. Al evaluar el efecto del contenido de almidón de maíz en la matriz, se encontró que la incorporación de AgNPs en una concentración de 143 ppm no permitió el crecimiento del *Penicillium spp.* No se encuentran muchos reportes sobre el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata sobre hongos, pero, Cano y col. (2016) evaluaron el efecto inhibitorio de películas de almidón-PVA conteniendo AgNPs sobre cepas de *Penicillium spp.* y *Aspergillus niger* y observaron que la carga microbiana se redujo a partir de 85,6 ppm, mientras que la inhibición total se dio a 228,3 ppm.

Con respecto a la actividad antimicrobiana, todas las películas nanocompuestas inhibieron el desarrollo de los microorganismos ensayados en este trabajo de Tesis. Las características estructurales de las matrices desarrolladas juegan un papel importante, ya que, condicionan la exposición de las AgNPs limitando así su efectividad.

Teniendo en cuenta la capacidad antimicrobiana y las propiedades finales de los materiales obtenidos, las películas nanocompuestas formuladas con un contenido de almidón del 3 % y una concentración de 143 ppm de AgNPs sintetizadas *in situ*, se seleccionaron como la mejor opción para evaluar su aplicación como envase para alimentos.

4.5.5. Aplicación de las películas activas desarrolladas como envases para alimentos

Con el propósito de evaluar la efectividad de las películas nanocompuestas desarrolladas como envases activos, se determinó la vida útil de queso fresco mediante ensayos microbiológicos. La Figura 1.34 corresponde a fotografías de las muestras al inicio del ensayo y luego de diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C.

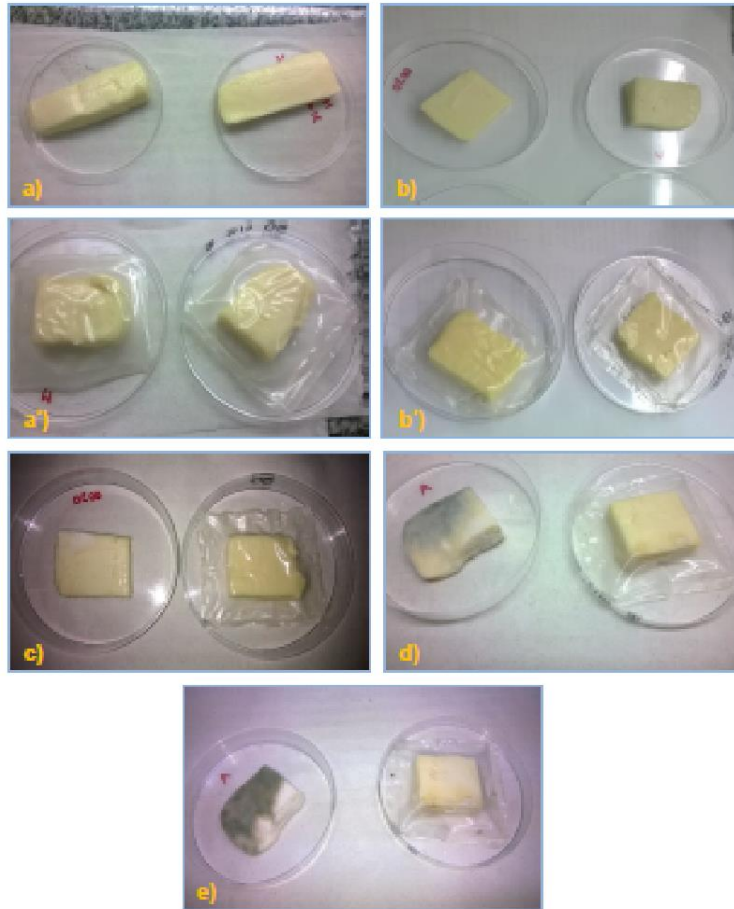


Figura 1.34: Fotografías correspondientes a muestras de queso fresco a los: a) y a') 0; b) y b') 7; c) 14; d) 21 y, e) 28 días de almacenamiento a 4 °C. Las muestras sin película corresponden al control.

Se realizó el recuento de los microorganismos aerobios totales, pero los valores obtenidos no fueron representativos debido a la flora láctica propia de la muestra de queso, por ese motivo se decidió evaluar la vida útil del producto realizando el recuentos de hongos y levaduras presentes.

La vida útil de las muestras de queso fresco refrigerado está determinada principalmente por el desarrollo de microorganismos. Particularmente, 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.

Se definió la vida útil del queso fresco como el tiempo necesario para alcanzar 10^6 UFC/g de muestra (López, 2011). Teniendo en cuenta este valor, la vida útil para la muestra control fue de 14 días, mientras que para la muestra envasada con la película nanocompuesta la vida útil media fue de 21 días (Figura 1.35).

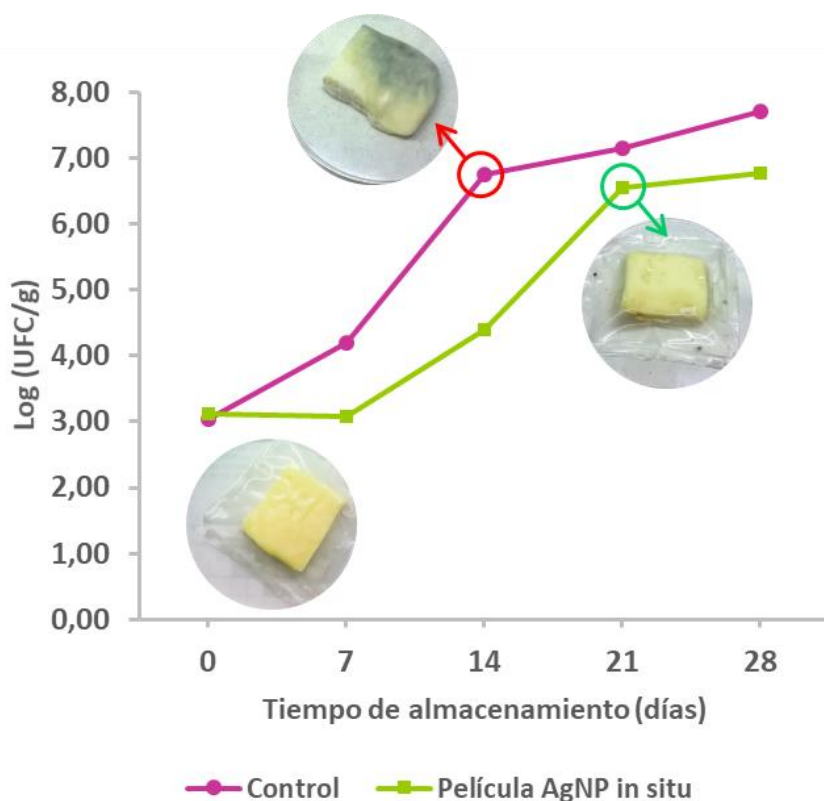


Figura 1.35: Recuentos (UFC/g) para las muestras de queso envasadas con películas sintéticas (control) y nanocompuestas conteniendo 143 ppm de AgNP *in situ*, almacenadas a 4 °C durante 28 días.

5. CONCLUSIONES

Se optimizaron las condiciones de síntesis de AgNPs utilizando una sal de Ag y un reductor natural, siendo necesario el agregado de almidón como agente estabilizante.

Fue posible acoplar la síntesis de nanopartículas de plata mediante el uso de reactivos amigables con el medioambiente a la preparación de suspensiones filmogénicas a base

de almidón. La síntesis de AgNPs *in situ* se realizó en las tres concentraciones de almidón estudiadas.

La espectrofotometría es una técnica simple que permite seguir la evolución de la síntesis de las AgNPs mediante la observación del plasmón. La morfología y el tamaño de los AgNPs obtenidos se estudiaron mediante diferentes técnicas de microscopía electrónica. Las medidas de potencial Z indicaron que las AgNPs resultaron estables en la suspensión filmogénica.

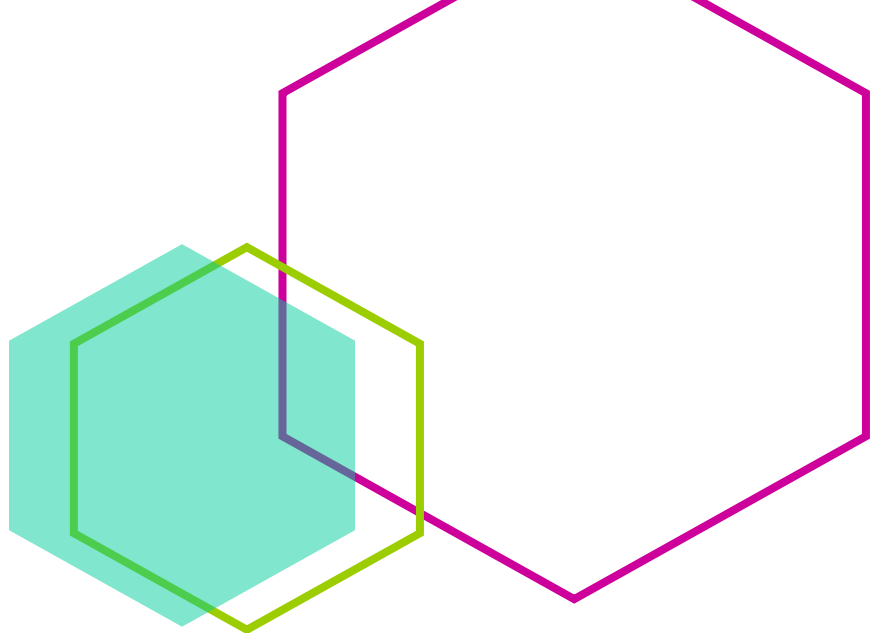
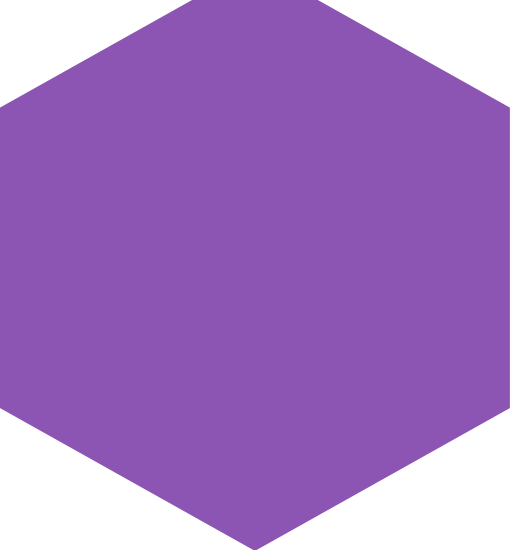
Las suspensiones filmogénicas formuladas con 3 y 5 % de almidón exhibieron un aumento en la viscosidad aparente tanto con el contenido de almidón como con la incorporación de AgNPs. Como era de esperarse, la cinética de secado estuvo condicionada por el contenido de almidón de los sistemas estudiados.

Se observó que el refuerzo de las matrices evidenciado a través de las propiedades mecánicas analizadas (módulo elástico, esfuerzo tensil y tenacidad) así como la WVP y la capacidad antimicrobiana fue dependiente de la concentración de AgNPs en los materiales compuestos. Se realizó la caracterización microestructural de los sistemas nanocompuestos; mediante SEM se evidenció que las AgNPs se encontraban integradas en la matriz poliméricas y a través de ATR-FTIR se confirmó la participación de los grupos OH del almidón en la estabilización de las AgNPs sintetizadas.

Con respecto a las propiedades finales de las películas de nanocompuestas, la incorporación de AgNPs afecta negativamente las propiedades ópticas de las películas que contienen 1 % de almidón. La matriz de la película obtenida con esta concentración de almidón fue débil y la inclusión de nanopartículas indujo defectos que afectan tanto a las propiedades mecánicas como a las de barrera. Aunque las películas formuladas con 5 % de almidón condujeron a una estructura más densa y compacta, la adición de AgNPs no evidenciaba un refuerzo adicional de la matriz desarrollada, sin afectar tanto las propiedades mecánicas como la WVP. La mejora de estas propiedades en películas formuladas con 3 % de almidón se atribuyó al refuerzo de la matriz por AgNPs, ya que se formó una estructura homogénea pero menos densa.

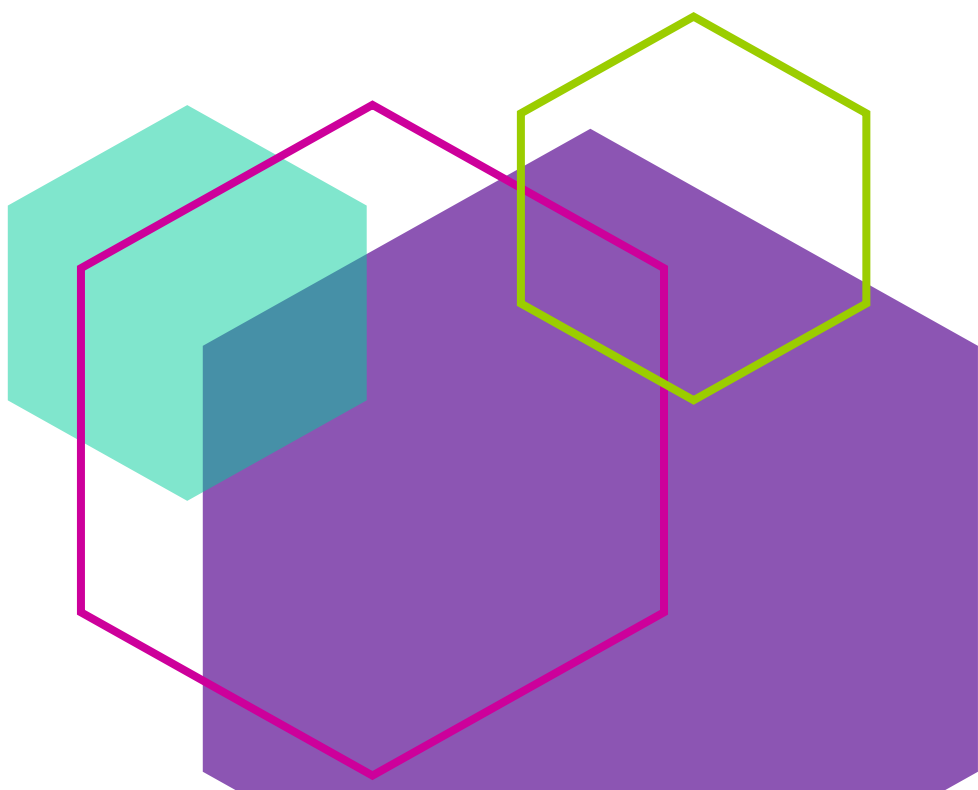
Además, la presencia de nanopartículas en la matriz de almidón permitió modular la solubilidad de las películas, independientemente de la temperatura ensayada.

Considerando la capacidad antimicrobiana y las propiedades finales de los materiales obtenidos, se seleccionaron las películas nanocompuestas formuladas con un contenido de almidón del 3 % y una concentración de 143 ppm de AgNPs sintetizadas *in situ*. A partir del termosellado de estas películas nanocompuestas se obtuvieron envases activos los que permitieron extender en 7 días la vida útil de quesos de pasta blanda.



CAPÍTULO 2

Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata obtenidas con los reductores naturales presentes en jugo de limón (*Citrus x limon*) (AgNP L)



1. INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en el Capítulo 1, la síntesis química de nanopartículas mediante mecanismos *bottom up* generalmente son simples, permiten obtener partículas de diferentes formas y tamaños dependiendo de los reactivos utilizados, y de las condiciones de reacción, además de posibilitar la obtención de un gran stock de NPs (Polte y col., 2012; Wu, Yang, y Wu, 2016). En general estas técnicas pueden requerir del empleo de reactivos tóxicos, los cuales suelen ser costosos y no son amigables con el medio ambiente. Debido a esto, los científicos se han esforzado en encontrar vías de síntesis “verde” precisas, es decir, se han encargado de evaluar cuáles son las fuentes naturales, y sus productos, que pueden utilizarse para obtener nanopartículas de una forma más segura.

El uso de extractos de plantas en síntesis verde de nanopartículas ha sido objeto de numerosas investigaciones (Kumar, Smita, Cumbal, Debut, y Pathak, 2014; Nasrollahzadeh y col., 2019; Ortega y col., 2021; Ren y col., 2016), a partir de las cuales se demostró que la formación de nanopartículas metálicas puede realizarse en su totalidad en la solución de la sal metálica, en tiempos relativamente cortos, e incluso a bajas temperaturas o temperatura ambiente, dependiendo del extracto vegetal utilizado. Luego de la elección del extracto natural, los principales parámetros que afectan son, la concentración del extracto y de la sal metálica, así como su naturaleza, la temperatura, pH y el tiempo de contacto de los reactivos (Rauwel, Küünal, Ferdov, y Rauwel, 2015). Particularmente, con respecto a la síntesis de nanopartículas de plata con productos vegetales, se pueden mencionar: las obtenidas con extractos de té verde (Rolim y col., 2019), con extractos de hojas de *Ginkgo Biloba* (Ren y col., 2016), AgNPs utilizando extractos de limón (Prathna y col., 2011, 2014; Selvakumar y col., 2016) y con extractos de cáscaras de cítricos (Kaviya, Santhanalakshmi, Viswanathan, Muthumary, y Srinivasan, 2011), entre otros.

Las ventajas de usar extractos de plantas para la obtención de NPs, es que se encuentran fácilmente disponibles, son seguros de manejar, y lo más importante es que poseen una gran variedad de componentes activos que pueden promover la reducción, en este caso de los iones Ag^+ , y la estabilización de las AgNPs obtenidas. Dentro de estos compuestos

que participan tanto de la reducción y recubrimiento (*capping*) de las nanopartículas se encuentran biomoléculas como, aminoácidos, azúcares, polisacáridos, enzimas, proteínas, vitaminas, ácidos orgánicos, polifenoles, flavonoides, entre otros (Mohapatra y col., 2015).

Los cítricos, y en particular el limón (*Citrus limon*), que es el que se va a utilizar en este capítulo de Tesis, presentan una gran variedad de polifenoles, flavonoides y terpenos (Xi, Lu, Qun, y Jiao, 2017); sin embargo el contenido de ácido cítrico, ascórbico y la presencia de azúcares reductores, posiblemente sean los responsables de la reducción y estabilización de los iones metálicos (Ag^+) y la estabilización de las nanopartículas (AgNPs). Además, otra razón por la cual es interesante la elección de este fruto, es su amplia disponibilidad.

Por otro lado, se ha demostrado que varios de los componentes presentes en los extractos del limón, presentan un amplio espectro de actividad biológica que incluye actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Debido a esto, se encuentran entre los antimicrobianos naturales más estudiados para aplicaciones alimentarias (Burt, 2004).

El limón es un fruto ácido y aromático, que se utiliza fundamentalmente como condimento y no tanto en forma directa como los otros cítricos dulces (naranjas o mandarinas), razón por la cual su consumo per cápita es menor (de acuerdo a datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación del año 2019, es de aproximadamente 3 kg/habitante/año). En lo que respecta al fruto (Figura 2.1), el limón es un hesperidio (fruto carnoso de corteza gruesa, dividido en varias celdas por telillas membranosas) de forma ovalada, de color amarillo intenso cuando alcanza su madurez. Tiene cáscara gruesa de gran porosidad, y en su interior, se encuentra la parte comestible formada por gajos (endocarpo); dentro de éstos están las vesículas que contienen el jugo. Sus semillas son pequeñas y puntiagudas (García Lidón, Del Río, Porras, Fuster, y Ortuño, 2003). Por último, se denomina pulpa a los residuos del fruto una vez exprimido.

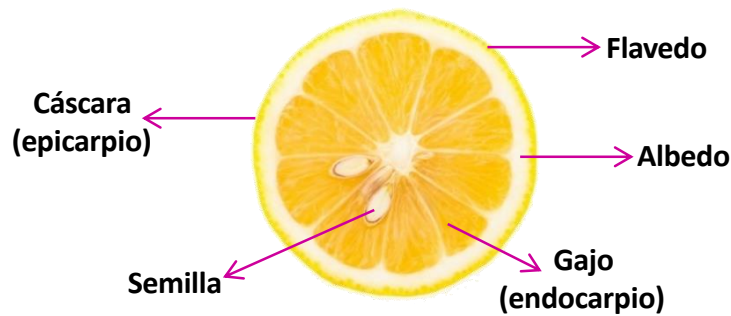


Figura 2.1: Corte transversal del fruto de limón en el cual se pueden observar las distintas partes constitutivas.

El contenido de jugo en el limón va aumentando durante el período de madurez hasta alcanzar un 40 - 46 % del peso total del fruto. Durante esta etapa, el contenido de sólidos solubles del jugo está representado principalmente por azúcares reductores y totales (glucosa, fructosa y sacarosa), a continuación le siguen los ácidos orgánicos (ácido cítrico en mayor proporción) y sus sales, y el resto corresponde a compuestos nitrogenados, vitaminas, elementos minerales y otras sustancias (Alvarez, Jorrat, y Genta, 2005).

El ácido cítrico es el principal ácido del endocarpo, conforma entre el 70 y 90 % del total de la acidez y su contenido permanece elevado durante todo el período de madurez. Químicamente es un ácido policarboxílico, débil, de origen natural, además es biodegradable, renovable y se clasifica como seguro para el uso en alimentos (GRAS), por ese motivo se lo incluye en muchos productos alimenticios como mermeladas, jugos, golosinas, entre otros.

Durante varios años se han investigado los efectos del ácido cítrico sobre matrices de almidón. Debido a su carácter policarboxílico, los grupos carboxilo del ácido interactúan con los grupos hidroxilo del almidón, lo cual mejora la resistencia al agua debido a la reducción de los grupos OH disponibles (Ghanbarzadeh, Almasi, y Entezami, 2011; Seligra, Medina Jaramillo, Famá, y Goyanes, 2016). Por otro lado, los grupos carboxilo también pueden formar puentes de hidrógeno con las cadenas de los constituyentes del almidón, evitando de esta forma la re-cristalización y retrogradación de la matriz (Ghanbarzadeh y col., 2011; Shi y col., 2008). También puede actuar como agente de entrecruzamiento, y de esta forma, mejorar tanto las propiedades mecánicas como de barrera (Olsson et al., 2013; Reddy y Yang, 2010; Seligra y col., 2016; Shi y col., 2008).

Sin embargo, algunos autores han reportado que bajo ciertas condiciones de ensayo el ácido cítrico puede generar la hidrólisis parcial del almidón (Ghanbarzadeh y col., 2011, Menzel y col., 2013, Olsson y col., 2013).

En el Capítulo anterior, se sintetizaron nanopartículas de plata directamente en la suspensión filmogénica (síntesis *in situ*) y se optimizó tanto el contenido de la NPs como la concentración de almidón en las películas nanocompuestas. Las matrices con 143 ppm de AgNPs exhibieron mejores propiedades mecánicas y de barrera, así como también actividad antimicrobiana. Asimismo, el contenido de almidón del 3% (p/v) dio lugar a suspensiones filmogénicas con un óptimo comportamiento reológico y propiedades finales de las películas obtenidas por moldeo y deshidratación que posibilitaron su aplicación para el envasado de alimentos.

En este Capítulo se sintetizaron AgNPs mediante otra técnica verde reduciendo el número de reactivos a AgNO₃ y jugo de limón natural. Una vez obtenidas y caracterizadas las nanopartículas se estudió su incorporación a suspensiones de almidón de maíz al 3 % (p/v), dado que esta matriz resultó ser la más efectiva en el caso de los sistemas nanocompuestos con AgNPs *in situ*. Asimismo, se comparan ambas técnicas de síntesis química, sus ventajas y desventajas con vistas a su implementación.

2. LOS OBJETIVOS PLANTEADOS EN EL PRESENTE CAPÍTULO FUERON:

- Obtener y caracterizar jugo de limón determinando los reductores naturales y compuestos activos presentes.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata utilizando los compuestos activos presentes en el jugo de limón natural (AgNP L) y optimizar las condiciones de síntesis.
- Evaluar la incorporación de las AgNP L a matrices de almidón de maíz con el fin de obtener películas nanocompuestas.
- Caracterizar los sistemas nanocompuestos, estudiando las propiedades relevantes que condicionan su aplicación para el envasado de alimentos, particularmente de panificados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo experimental de la siguiente sección se utilizaron reactivos de grado analítico, y las soluciones se prepararon con agua ultrapura con una resistencia específica de 18 MΩ.

3.1. Obtención del jugo de limón

Se cosecharon y seleccionaron limones (*Citrus limon*) de una plantación de la ciudad de La Plata, Argentina (34°56'26"S 57°59'44" W). Luego fueron llevados al laboratorio donde se lavaron con agua corriente para eliminar cualquier tipo de impureza que pudiera estar sobre la superficie y a continuación se enjuagaron con agua destilada. Una vez limpios, los limones se exprimieron y el jugo se filtró y centrifugó a 10000 rpm, durante 10 minutos a 0 °C (Sorvall® RC 5B Plus, EE.UU.). A continuación se separó el jugo del pellet y se mantuvo a 0°C hasta el momento de su uso.

3.2. Caracterización del jugo de limón obtenido

Se determinaron los parámetros fisicoquímicos generales como el contenido de sólidos solubles totales (SST), la acidez titulable y la densidad. Además, se realizó el análisis de los componentes de especial relevancia en la síntesis de nanopartículas de plata, como el contenido de azúcares reductores, ácido ascórbico y de compuestos fenólicos.

3.2.1. Sólidos solubles totales (SST)

Los sólidos solubles totales en el jugo de los cítricos están compuestos mayoritariamente por los azúcares presentes en el fruto, seguido por los ácidos orgánicos (principalmente ácido cítrico) y sus sales, y el resto corresponde a compuestos nitrogenados, vitaminas, minerales y otros componentes solubles en agua (García Lidón y col., 2005).

La determinación del contenido de sólidos solubles se realiza utilizando un refractómetro, el cual se basa en el cambio del índice de refracción de la luz generado por la naturaleza y concentración de los solutos disueltos (por ejemplo sacarosa). La unidad de medida son los °Brix y según esta escala, 1 °Brix correspondería a un índice de refracción de una solución de sacarosa en agua al 1 % (p/v).

Los SST se determinaron de acuerdo al método oficial de la AOAC 932.12 (AOAC 2007) colocando una gota del jugo de limón filtrado y centrifugado en un refractómetro digital MA871 (Milwaukee Instruments, China), previa calibración del mismo con agua destilada. Las mediciones se realizaron al menos por duplicado y el contenido de SST se expresó en °Brix.

3.2.2. Acidez titulable

Los ácidos orgánicos son componentes importantes de los sólidos solubles de los jugos cítricos, que en el caso de los limones y limas, son los más abundantes.

La acidez de los jugos normalmente se expresa como ácido cítrico anhidro, uno de los ácidos mayoritarios presentes, además del málico (el segundo más abundante) y oxálico (en mucho menor proporción), aunque se cometería un error en la determinación éste es muy pequeño, ya que los pesos equivalentes de los ácidos cítrico y málicos son similares iguales (64,02 y 67,02 g/eq respectivamente) (García Lidón y col. 2005).

Para la determinación de la acidez titulable se realizó una valoración potenciométrica ácido-base utilizando NaOH como titulante y un electrodo de membrana de vidrio que permitió determinar el punto final de la titulación a pH 8,1 (Nielsen, 2017). La acidez titulable se determinó de acuerdo al método AOAC 945.15 (AOAC, 2007) en una dilución 1/5 del jugo de limón tratado con agua ultrapura. La muestra se tituló con una solución de NaOH 1N hasta pH 8,1 utilizando un pHmetro AD800 (Adwa, Hungría). La acidez, se expresó como g de ácido cítrico por cada 100 ml de jugo y se calculó según la ecuación:

$$Acidez \left(\frac{g \text{ AC}}{100 \text{ mL de jugo}} \right) = \frac{V \times N \times f \times 100}{M} \quad [2.1]$$

donde, V corresponde al volumen de NaOH gastado (mL), N a la normalidad del NaOH (N), f es el peso del miliequivalente del ácido cítrico (0,064 g/eq), y M es la alícuota de muestra (mL). La determinación se realizó por duplicado.

3.2.3. Densidad

La densidad se determinó indirectamente registrando la masa (g) de un volumen de jugo de limón exactamente medido (1mL) con una balanza de precisión analítica. La muestra

se analizó a temperatura ambiente y por triplicado. Los resultados se expresaron en g/mL.

3.2.4. Contenido de azúcares reductores

En la mayoría de los cítricos, incluyendo el limón, los principales azúcares presentes son glucosa, fructosa y sacarosa en proporciones 2:2:1 y su contenido aumenta a medida que el fruto madura (García Lidón y col., 2005).

Los azúcares reductores son aquellos monosacáridos (glucosa, fructosa, lactosa, entre otros) y otros carbohidratos de bajo peso molecular que, presentan grupos carbonilo e hidroxilo disponibles para reaccionar y así reducir a un agente oxidante. Por ejemplo, el grupo aldehído de una aldosa reduce al agente oxidante, y se transforma en un grupo carboxílico. Las cetosas también son azúcares reductores ya que en condiciones de reacción alcalinas se isomerizan transformándose en aldosas (Fennema, 2008). Existen varios métodos para determinar estos azúcares que se basan en la reducción de un ion metálico como los métodos de Fehling, Benedict y Somogyi-Nelson.

Según González-Blair y Castellanos-Domínguez (2003), el método de Somogyi-Nelson es altamente reproducible y permite determinar azúcares reductores presentes en concentraciones muy bajas (20 - 180 $\mu\text{g/mL}$). Al colocar el reactivo de Somogyi en contacto con la solución de azúcar reductor y calentar, el reactivo en su medio básico (pH = 9) oxida el azúcar formando un óxido de Cu (I), el Cu_2O , de color rojizo e insoluble en agua. Una vez que se incorpora el reactivo de arseno-molibdato (reactivo de Nelson) reacciona con el ácido aldónico obtenido durante la oxidación del azúcar con el reactivo de Somogyi, reduciendo el complejo amarillo (molibdoarsenato de amonio) a azul de molibdeno. Así, la intensidad del color desarrollado durante la reacción, medido a 520 nm, es proporcional a la cantidad de Cu_2O formado, y por consiguiente, a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra.

El contenido de azúcares reductores presentes en el jugo de limón previamente filtrado y centrifugado se determinó mediante el método de Somogyi-Nelson modificado según González-Blair y Castellanos-Domínguez (2003). La muestra se analizó por duplicado y las medidas se realizaron en un espectrofotómetro U-1900 HITACHI (Japón) a 520 nm. Como se mencionó anteriormente, la glucosa y la fructosa están presentes

principalmente en el jugo de limón (Alvarez y col., 2005; García Lidón y col., 2003), por este motivo se prepararon soluciones estándar de estos monosacáridos para la cuantificación y los resultados se expresaron en mg de glucosa y fructosa cada 100 mL de jugo, respectivamente.

3.2.5. Cuantificación de ácido ascórbico

El ácido ascórbico (vitamina C) es la vitamina más abundante en los cítricos, por lo que éstos constituyen la principal fuente natural para su obtención. Es una cetolactona de seis carbonos, que tiene relación estructural con la glucosa y otras hexosas, y es muy inestable frente al calor y oxidación. Además del uso nutricional, el ácido ascórbico se utiliza como antioxidante protegiendo el color y sabor de ciertos alimentos.

La cuantificación del contenido de ácido ascórbico (AA) en el jugo de limón obtenido se realizó por cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) de acuerdo con el protocolo propuesto por Monroy, Rivero, García, y García (2017). Para este propósito, se utilizó un HPLC modelo Waters 1525 (Milford, MA, EE. UU.), equipado con una bomba binaria, un detector óptico de índice de refracción Waters 2998, y otro de arreglo de diodos (Milford, MA, EE. UU.). Para la determinación fue necesario realizar una dilución de 1/4 de la muestra con la fase móvil utilizada, en este caso, ácido metafosfórico:acetonitrilo en relación 93:7 y la posterior filtración con una membrana de 0,45 μm (Osmonics Inc., GE ACETATE Plus, Brasil). Se utilizó ácido ascórbico patrón para realizar la curva de calibración, en la que se relacionó el área del pico cromatográfico con la concentración de AA. Los resultados informados (mg/100 mL) corresponden a determinaciones al menos por duplicado.

3.2.6. Contenido de polifenoles

La composición de polifenoles del jugo de limón se analizó por cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) utilizando el equipo mencionado anteriormente y siguiendo el protocolo descrito por Reyes-Álvarez y Lanari (2020). Todos los compuestos se identificaron comparando el tiempo de retención y las características espectrales de los picos con los estándares comerciales (Reyes-Álvarez y Lanari 2020) y luego se cuantificaron de acuerdo con el área del pico del estándar correspondiente (Xi y col., 2017). Los estándares utilizados fueron ácido gálico, clorogénico y cafeico para los

polifenoles y rutina como flavonoide. Los resultados informados ($\mu\text{g/mL}$ jugo) corresponden a determinaciones al menos por duplicado.

3.3. Síntesis y caracterización de las AgNP L

Las nanopartículas de plata se obtuvieron de acuerdo con el método propuesto por Prathna y col. (2011) realizando algunas modificaciones (Figura 2.2). Se añadió una solución de AgNO_3 $6,5 \cdot 10^{-3}$ M al jugo de limón obtenido previamente, en una relación de volumen 1:4 (AgNO_3 : jugo de limón) bajo agitación constante, lo que condujo a una solución stock de AgNP L $1,3 \cdot 10^{-3}$ M. La síntesis se llevó a cabo a tres condiciones diferentes de tiempo-temperatura: 130; 70 y 30 min a 45; 67,5 y 90 °C, respectivamente, en un baño termostático, para evaluar el efecto de la temperatura en la obtención de las nanopartículas. Asimismo, las suspensiones control se prepararon reemplazando el volumen de la solución de AgNO_3 por agua ultrapura y luego se sometieron a las condiciones de calentamiento mencionadas anteriormente.

Las nanopartículas obtenidas se identificaron como AgNP L₄₅, AgNP L_{67,5} y AgNP L₉₀, respectivamente.

Con el fin de realizar el seguimiento de la formación de las AgNP L, se tomaron alícuotas de 3 mL a diferentes tiempos de reacción, se les realizó una dilución 1/5 con agua ultrapura y a continuación se analizaron mediante espectroscopía de absorción UV-visible en el rango de longitud de onda de 200 a 700 nm utilizando un espectrofotómetro T90 + UV/vis (PG Instruments, EE. UU.), como se describió en la Sección 3.2.1 del Capítulo 1.

3.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una vez que se obtuvieron las nanopartículas, se examinó la morfología de las mismas mediante TEM. Para visualizar las AgNP L se realizó una dilución 1/100 de las muestras con agua ultrapura, se colocaron gotas en una rejilla y se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 10 min. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un equipo JEOL-JEM 1200EXII, (Jeol, Japón) equipado con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, EE. UU.). Finalmente, las micrografías se procesaron utilizando el programa ImageJ SoftwareTM a partir del cual se obtuvieron los

tamaños y la polidispersidad de las AgNP L a distintas temperaturas, como se describió en el Capítulo 1 Sección 3.2.2.

3.3.2. Potencial Z

El potencial Z se determinó como se describió en el Capítulo 1 Sección 3.2.4. Las medidas se realizaron en un equipo SZ-100 Nanopartica (Horiba Scientific, Japón) para lo cual se preparó una dilución 1/100 de las soluciones de nanopartículas utilizando KNO_3 10^{-3}M para fijar la fuerza iónica y estabilizando previamente las muestras durante 30 min. Para la determinación se aplicó un voltaje de 3,3 V a 25 °C, las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

3.3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos se registraron utilizando un espectrómetro Nicolet-iS10 FTIR (Thermo Scientific, EE. UU.). Para ello se colocó 1 gota de la suspensión conteniendo las AgNP L en el soporte del equipo y los espectros se midieron en el rango de 4000 – 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . Se realizaron al menos 32 escaneos para cada muestra. Los resultados obtenidos se analizaron a través del software Omnic 9™ (Thermo Scientific, EE. UU.).

3.4. Estabilidad de las AgNP L obtenidas a las diferentes temperaturas

Una propiedad importante a la hora de pensar en la posible aplicación de las nanopartículas metálicas es su estabilidad, es decir, que no presenten cambios apreciables en su morfología o propiedades ópticas en función del tiempo de almacenamiento (Pinto y col., 2010). Esto también permite definir cuáles podrían ser las mejores condiciones para almacenar las NPs luego de su síntesis y antes de su aplicación.

La estabilidad de las nanopartículas de plata está dada por un conjunto de características como su tamaño, forma, los agentes de recubrimiento o *capping*, presencia de macromoléculas orgánicas, pH y fuerza iónica. Los factores mencionados participan tanto en las interacciones electrostáticas como también generan efectos estéricos (Schmid, 2011).

Así para estudiar la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas, las suspensiones de AgNP L₉₀ se almacenaron bajo condiciones de refrigeración (4 °C). Se realizó un estudio por espectroscopía de absorción UV-visible mediante el análisis de los plasmones de resonancia superficial (SPR) entre 400 - 500 nm. Las muestras fueron evaluadas durante un período de almacenamiento de 395 días.

3.5. Películas nanocompuestas de almidón de maíz conteniendo AgNP L y su caracterización

Las películas nanocompuestas a base de almidón de maíz se obtuvieron por el método de *casting* (moldeo y deshidratación) como se detalló en el Capítulo 1 sección 3.3 y según se describe en el esquema propuesto (Figura 2.2). En esta ocasión se agregaron diferentes volúmenes de la solución conteniendo las nanopartículas obtenidas previamente a 90 °C durante 30 min, AgNP L₉₀, a las suspensiones de almidón de maíz 3 % p/v de forma tal de obtener las películas nanocompuestas. Los volúmenes agregados del stock de AgNP L₉₀ a 100 mL de suspensión filmogénica fueron: 385, 770, 1920 y 3850 µL, lo que condujo a un contenido final de Ag de 5, 10, 25 y 50 µM, respectivamente. A continuación, las suspensiones nanocompuestas se gelatinizaron a 90 °C durante 20 min con agitación continua en un baño termostático, luego fueron enfriadas hasta 50 °C y finalmente se les añadió un 30 % p/p de glicerol como plastificante.

Seguidamente se plaquearon las suspensiones filmogénicas sobre placas acrílicas (relación de moldeo = 0,3144 g/cm²) y se secaron en un horno de convección forzada por aire (50 °C durante 5 h). Una vez finalizado el proceso de secado, las películas se retiraron del molde y se acondicionaron con 70 % de HR y 25 °C previamente a la caracterización.

La concentración final de las AgNP L₉₀ en los materiales activos se expresó como mg de Ag por kg de película seca, correspondiendo a 14,3; 28,6; 71,5 y 143 ppm.

Las películas control se obtuvieron reemplazando los volúmenes de AgNP L₉₀ por los equivalentes de una solución preparada con 1 parte de agua ultrapura y 4 partes de jugo de limón filtrado (a fin de poder estudiar el efecto que los componentes del jugo de limón ejercen en la matriz de almidón); y luego se siguió el mismo protocolo para

obtener las películas. Así, dependiendo del volumen agregado de esta solución se obtuvieron las películas control Cont L 14,3; Cont L 28,6; Cont L 71,5 y Cont L 143 ppm.

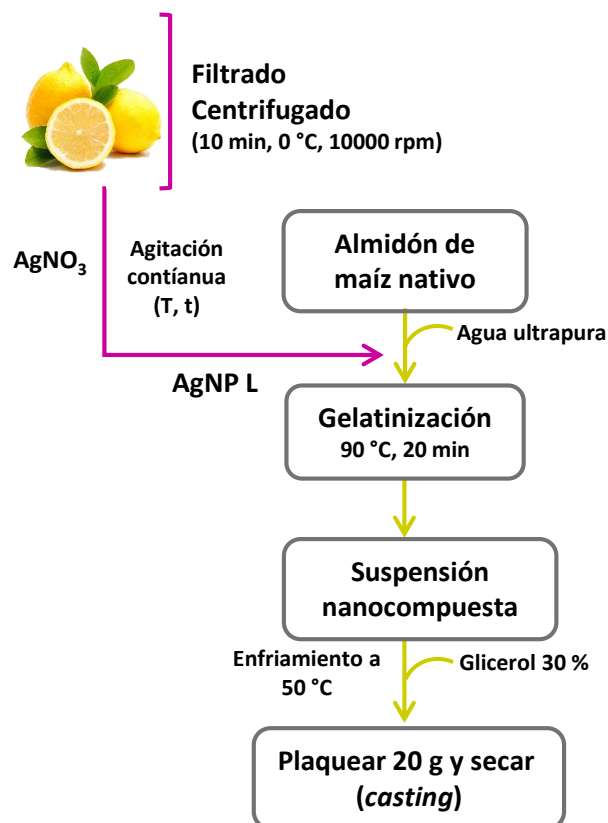


Figura 2.2: Esquema de síntesis de las AgNP L y posterior obtención de las películas nanocompuestas.

3.5.2. Caracterización de las películas nanocompuestas

Para la caracterización, tanto de las películas nanocompuestas como su correspondiente control, se siguió la metodología propuesta en el Capítulo 1.

Se determinó el espesor (Sección 3.4.1), propiedades ópticas (Sección 3.4.2), la permeabilidad al vapor de agua (Sección 3.4.3), la solubilidad y el contenido de humedad (Sección 3.4.4) y las propiedades mecánicas (Sección 3.4.5) según las metodologías descritas previamente.

3.5.2.1. Color superficial

El color es uno de los factores esenciales en el mensaje que da un envase, ya que cumple varias funciones, las cuales van desde identificar a una determinada marca, hasta denotar la calidad del contenido. Teniendo en cuenta esto y considerando que el jugo de limón aportaría su tonalidad característica, se determinó el color superficial de las películas control y nanocompuestas siguiendo la técnica descrita en el Capítulo anterior (Sección 3.4.2.1). Además se realizó el seguimiento del cambio de color de las películas luego de 14 días de almacenamiento bajo condiciones controladas (25 °C y 70 % HR).

Utilizando la escala CIELab se midió la luminosidad (L^*), y los parámetros de cromaticidad (a^* y b^*), y a partir de éstos se calculó la diferencia de color (ΔE). Se registraron cinco medidas en diferentes posiciones para cada muestra, al tiempo inicial y luego de los 7 y 14 días de almacenamiento. Para calcular la diferencia de color de las muestras almacenadas se usaron como valores de referencia los parámetros de color obtenidos para las muestras recién preparadas (tiempo inicial). Los resultados informados en este trabajo de Tesis corresponden a los valores promedio obtenidos, mostrándose además la desviación estándar.

3.5.2.2. Capacidad de termosellado

La capacidad de termosellado se evaluó en películas nanocompuestas conteniendo 71,5 ppm de AgNP L y su respectivo control. Esta propiedad se determinó de acuerdo a lo indicado en la Sección 3.4.6 del Capítulo 1 y según lo publicado en un trabajo previo (Ortega y col., 2017). Se registraron los patrones mecánicos y se determinaron los modos de falla de acuerdo con el método estándar ASTM F88-00 (2001). La resistencia máxima y media a la tracción del termosellado se determinó y expresó en MPa, mientras que el área bajo la curva se calculó como indicadora de la energía necesaria para romper el termosellado y se expresó en J.

3.5.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Según lo mencionado en la Sección 3.4.7.1 del Capítulo 1, los espectros FTIR se adquirieron usando un espectrómetro FTIR Nicolet-iS10 (Thermo Scientific, EE. UU.) con

un accesorio de reflectancia total atenuada. Los espectros se lograron a partir de 32 escaneos acumulados a una resolución de 4 cm^{-1} en el rango de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$. Las mediciones se analizaron por triplicado utilizando el software Omnic 9TM (Thermo Scientific, EE. UU.).

3.5.2.4. Espectroscopía de difracción de rayos X (DRX)

Se utilizó un difractómetro X'Pert Pro Analytical Model PW 3040/60 (Almelo, Holanda). Las condiciones de medida fueron las mismas que las descritas en la Sección 3.4.7.2 del Capítulo 1 para las películas con AgNPs *in situ*. El grado de cristalinidad de las muestras control y nanocompuestas se obtuvo mediante el procesamiento de los difractogramas con el programa Origin versión 8.5, (OriginLab Corporation, EE. UU.).

3.5.2.5. Calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC)

La información generada por las técnicas de análisis térmico es de utilidad para caracterizar el comportamiento amorfo y cristalino, las transiciones polimórficas entre otras propiedades térmicas de los materiales.

Para las películas desarrolladas en este capítulo se realizó el análisis térmico por MDSC según lo descrito anteriormente (Capítulo 1, Sección 3.4.7.3), y utilizando el mismo equipo, un calorímetro de barrido diferencial Q100 controlado por el módulo TA 5000 (TA Instruments, EEUU). Las medidas se analizaron por duplicado.

3.5.2.6. Micro-espectroscopía Raman

A diferencia de FTIR, que implica absorción de radiación infrarroja, Raman es una técnica de dispersión. En ella se mide la intensidad y frecuencia de fotones que se dispersan en el material al ser irradiado con luz monocromática de alta intensidad (un láser, típicamente de 785 nm). Es una técnica efectiva en el rango de $250 - 2900\text{ cm}^{-1}$, al medir el desplazamiento de la longitud de onda de la luz dispersada respecto al incidente (desplazamiento Raman). Al igual que FTIR, la técnica Raman investiga modos de vibración fundamentales, resultando en una excelente selectividad molecular; sin embargo, Raman es una técnica libre de la interferencia debida a bandas de agua. Su principal desventaja es que algunas muestras presentan fluorescencia, lo que puede

enmascarar la señal Raman y dificultar las mediciones (McCreery y col., 1998, Jenck 2010).

Los espectros Raman se adquirieron con un microscopio de barrido confocal Horiba-Jobin Yvon XPlora Plus (Horiba Ltd., Kyoto, Japón). Se colocaron películas control o nanocompuestas en un portaobjetos de vidrio y se registraron los espectros Raman en la zona comprendida entre los 200 y 3000 cm^{-1} y con una potencia láser de 4 mW, que es lo suficientemente baja como para evitar daños estructurales a la muestra con un objetivo de 100x.

3.6. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas desarrolladas

La actividad antimicrobiana tanto de las películas nanocompuestas como control se evaluó mediante el método de difusión en agar detallado anteriormente (Capítulo 1, Sección 3.5).

Las placas de Petri conteniendo Agar Mueller-Hinton (Merck) se inocularon con 10^4 UFC/mL del inóculo correspondiente preparado en caldo triptona soja (TBS). Los microorganismos ensayados fueron por un lado, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC y *E. coli* ATCC (Gram negativos) y además, *S. aureus* ATCC (Gram positivo). Sobre dichas placas se colocaron las muestras de películas a ensayar (2 cm de diámetro) y se incubaron a 37 °C realizando observaciones visuales transcurridas 24 y 48 h. El ensayo se realizó por duplicado para cada microorganismo.

3.7. Aplicación de las películas nanocompuestas desarrolladas como separadores de rebanadas de pan

El envejecimiento y desarrollo de mohos son los principales factores que restringen la vida útil y calidad del pan lacteado. Particularmente los hongos, la mayoría de las veces, son los que limitan la vida útil del pan y de ciertos productos de panadería. Debido a la presencia de un 40 % de agua, el pan tiene una actividad acuosa (a_w) de alrededor de 0,96; haciéndolo susceptible al crecimiento de mohos (Cioban, Alexa, Sumalan, y Merce, 2010; Noshirvani, Ghanbarzadeh, Rezaei Mokarram, y Hashemi, 2017). Generalmente, la vida útil de estos productos sin agregado de conservantes es de aproximadamente 3 a 4 días (Muizniece-Brasava y col., 2012), siendo necesario el agregado de conservantes a

la masa para prolongar su período de comercialización. Dado que los consumidores actualmente demandan alimentos naturales/orgánicos sin el agregado de conservantes químicos, una posible alternativa sería el uso de envases activos que permitan prolongar la vida útil del pan lacteado sin la incorporación de conservantes químicos en la formulación del producto.

Para este ensayo, se utilizó pan blanco tipo lacteado elaborado especialmente en una panadería artesanal, sin el agregado de conservantes químicos. La composición de los panes incluyó: harina de trigo enriquecida según Ley 25.630, agua, leche, azúcar, levadura y sal. Se cortaron rebanadas de 1,5 cm de espesor y se envasaron en bolsas plásticas Ziploc® utilizando como separador de las mismas las películas desarrolladas en la Sección 3.5 así como un material sintético (LDPE PD 141 CRYOVAC®), utilizado en el Capítulo 1 Sección 3.7. Las muestras se almacenaron a 20 °C y 60% HR por 7 días. Durante el almacenamiento de los panes se realizó una inspección visual y el recuento de microorganismos, mohos y levaduras se realizó a tiempo inicial y luego de 3, 5 y 7 días. A tal fin, se tomaron 10 g de pan, se homogeneizaron utilizando un Stomacher Seward Modelo 400 (Inglaterra) con 90 mL de agua peptona al 0,1 % estéril durante 30 seg. Para disminuir el error del muestreo se realizaron duplicados. Luego se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-4}) y 100 μ L se sembraron en placas de Petri conteniendo medio YGC (Extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol) para el crecimiento de hongos y levaduras y, agar nutritivo para microorganismos totales. Las placas se incubaron 5 días a 25 °C para hongos y levaduras y, 48 h a 37 °C para el recuento de microorganismos aerobios totales. El recuento se determinó por conteo del número de unidades formadoras de colonias, expresándose los resultados en una escala logarítmica como, log UFC/g de pan.

3.8. Análisis estadístico

Para el análisis multifactorial de la varianza, así como las regresiones lineales y no lineales, se utilizó los softwares Systat (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, EE. UU.) Versión 13.0 e InfoStat versión 2017 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La prueba de discriminación media de la diferencia menos significativa de

Fisher (LSD) permite determinar las diferencias en las propiedades de las películas; se usó un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del jugo de limón

El crecimiento del fruto es un proceso que se extiende desde la floración hasta la maduración, y ésta se define como el conjunto de cambios externos, de sabor y de textura que el fruto experimenta cuando alcanza su tamaño máximo y completa su desarrollo. Los cambios que sufren los frutos cítricos durante la etapa de maduración se han estudiado ampliamente. En el limón, el contenido de jugo se va incrementando a lo largo de este período, hasta alcanzar un 40 - 46 % del total y precisamente durante la última etapa, aumentan los sólidos solubles, sobre todo azúcares y compuestos nitrogenados, mientras que la acidez disminuye progresivamente como consecuencia, fundamentalmente, de un proceso de dilución (García Lidón y col., 2005).

La Tabla 2.1 muestra el análisis de los parámetros fisicoquímicos característicos y de mayor importancia en el jugo de limón, y que a su vez, intervienen en la síntesis de nanopartículas de plata. Se puede observar que el contenido de SST resultó ser más bajo que el valor estándar (8,76) especificado por la Asociación de la Industria de Jugos y Néctares de frutas y verduras de la Unión Europea (AIJN, 2002) y que el indicado por la Norma General del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (8,0). Sin embargo, tanto este valor como la acidez titulable y el pH= 2,1 del jugo de limón, se encuentran dentro del rango de datos reportados para los jugos de limón cultivados en la provincia de Tucumán, Argentina, según lo publicado por Álvarez (2005). En los jugos cítricos este parámetro se debe principalmente al contenido de ácido cítrico, el cual representa entre el 70 - 90 % del total de la acidez en el caso del jugo de limón; en estos frutos también se encuentran cantidades menores de ácido málico y trazas de oxálico, como ya se mencionó. Cabe destacar que la densidad del jugo fue similar a la reportada por este autor, siendo la misma de 1,035 g/mL.

Dentro de los compuestos químicos presentes en el jugo de limón, se espera que algunos tengan una mayor participación en la síntesis de nanopartículas. En primer lugar se

pueden mencionar los azúcares reductores y ácido ascórbico, quienes podrían participar en la reducción de los iones metálicos, mientras que el ácido cítrico, sería el responsable de regular el pH del medio, mantener la plata en solución y el citrato podría actuar como agente de *capping*. Otras biomoléculas que se encuentran en el jugo y podrían tener cierto grado de participación, ya sea en la etapa de reducción o de recubrimiento, son aminoácidos, polifenoles, flavonoides y terpenos. Con respecto a los azúcares reductores los valores obtenidos fueron ligeramente superiores a los informados por Álvarez (2005) para jugos de limón cultivados en Argentina, siendo 5,57 y 5,56 mg/mL para glucosa y fructosa respectivamente. Una tendencia similar siguió la concentración de ácido ascórbico, la cual fue de $71,8 \pm 0,6$ mg/100 mL, algo mayor a lo reportado por Marín, Martínez, Uribealago, Castillo, y Frutos (2002) quienes informaron valores en el rango de 25,2 - 76,3 mg/100 mL, los cuales dependen tanto del procedimiento de extracción del jugo como de la variedad de limón utilizado.

Tanto los polifenoles como los flavonoides son componentes fitoquímicos que presentan notables efectos benéficos sobre la salud humana (García Lidón y col., 2005). Con respecto a la obtención de nanopartículas, son una fuente natural para la bio-reducción de iones metálicos a NPs metálicas y como agentes de *capping*, encontrándose de manera abundante en una gran variedad de plantas y extractos vegetales. Un aporte adicional de estos compuestos en las nanopartículas, es que les confieren actividad antioxidante según lo reportado por algunos autores (Saravanakumar y col., 2015, Rolim y col., 2019, Zhang y Jiang 2019). Mediante la técnica de HPLC se detectaron tres ácidos fenólicos en el jugo de limón utilizado para la obtención de AgNP L: gálico ($2,4 \pm 0,6$ µg/mL), clorogénico ($26,7 \pm 1,9$ µg/mL) y cafeico ($223,2 \pm 7,6$ µg/mL), así como un flavonoide; rutina ($24,8 \pm 2,6$ µg/mL). Xi y col. (2017) llevaron a cabo un exhaustivo estudio sobre el contenido de polifenoles en diferentes lugares del fruto del limón, encontrando que los ácidos cafeico y clorogénico eran los predominantes, a los cuales le siguieron el ácido gálico y ferúlico; todos ellos prevalecieron en la cáscara. Diversos estudios han sido responsables de identificar los polifenoles presentes en el jugo de limón, así como de evaluar sus propiedades bioactivas (Andrés-Lacueva y col., 2009; Kelly, Kelly, y O'Mahony, 2019).

Los datos obtenidos pueden verse afectados por la etapa de maduración en la que se encontraban los frutos al momento de la cosecha, ya que como se mencionó anteriormente los componentes del limón aumentan o disminuyen a medida que transcurre su evolución hasta convertirse en un fruto maduro.

Tabla 2.1: Parámetros fisicoquímicos y compuestos relevantes presentes en el jugo de limón obtenido.

COMPONENTES DEL JUGO DE LIMÓN		VALOR
Sólidos solubles totales (° Brix)		7,60
Acidez titulable (mg AC/100 mL jugo)		5,43 ± 0,3
Azúcares reductores (mg/mL jugo)	Glucosa	7,35 ± 0,03
	Fructosa	8,41 ± 0,04
Ácido ascórbico (mg/100 mL jugo)		71,8 ± 0,6
Polifenoles (µg/mL jugo)	Ácido gálico	2,4 ± 0,6
	Ácido clorogénico	26,7 ± 1,9
	Ácido cafeico	223,2 ± 7,6
Flavonoides (µg/mL jugo)	Rutina	24,8 ± 2,6

4.2. Obtención de las AgNP L

La síntesis química de nanopartículas posee algunas ventajas respecto a otras técnicas. Entre ellas se puede mencionar que, son métodos simples, controlando las condiciones de reacción se pueden obtener partículas de diferentes formas y tamaños y, además posibilitan la obtención de soluciones stock de nanopartículas ya que son en general muy estables (Polte y col., 2012).

En este Capítulo del presente trabajo de Tesis, se sintetizaron nanopartículas de plata a través de la reducción de Ag^+ por los compuestos activos presentes en el jugo de limón y la obtención de las mismas se monitoreó mediante espectroscopía UV-vis. Las nanopartículas metálicas exhiben diferentes colores dependiendo de su morfología y tamaño, y estos colores surgen debido a la excitación del plasmón de resonancia superficial (SPR). En esta ocasión, se observó un cambio de color en la suspensión de incolora hacia un tono anaranjado-rojizo debido a la excitación del SPR en las AgNP L (Figura 2.3).

La Figura 2.3 muestra los espectros de absorción característicos en función del tiempo de reacción, los cuales indican la formación de nanopartículas de plata en el medio de reacción. Los espectros se caracterizaron por la presencia del SPR típico ubicado alrededor de 420 - 460 nm en la región visible, mientras que, en la zona de absorción UV se observaron los picos correspondientes a componentes del jugo de limón, como polifenoles (325 nm), flavonoides (280 nm) y ácido ascórbico (245 nm). Los picos caracterizados para los distintos componentes del limón coincidieron con los ya estudiados por Petrus y Dougherty (1973). Asimismo, Selvakumar y col. (2016) también informaron que los compuestos presentes en el extracto de limón presentan picos de absorción localizados entre 200 y 400 nm. Independientemente de la temperatura de síntesis utilizada, los picos de absorbancia correspondientes a los componentes del jugo de limón se vieron ligeramente afectados (respecto a la solución control), atribuyéndose los cambios observados probablemente a la condensación de los polifenoles presentes.

En general, se observó que cuanto mayor era la temperatura de síntesis, más rápida era la estabilización de los plasmones presentes en los espectros de UV-vis, lo que indica la eficiencia del proceso. Por lo tanto, fueron necesarios 130 minutos para lograr esta condición cuando la reacción se realizó a 45 °C (Figura 2.3 a). Mientras que, cuando la síntesis se realizó a 67,5 °C y 90 °C, la estabilización del espectro de absorbancia se alcanzó a los 70 y 30 minutos, respectivamente (Figura 2.3 b y c).

Según Kaviya y col. (2011) cuando la síntesis procede a mayor temperatura, los reactivos se consumen rápidamente y finalmente conducen a la formación de nanopartículas más pequeñas.

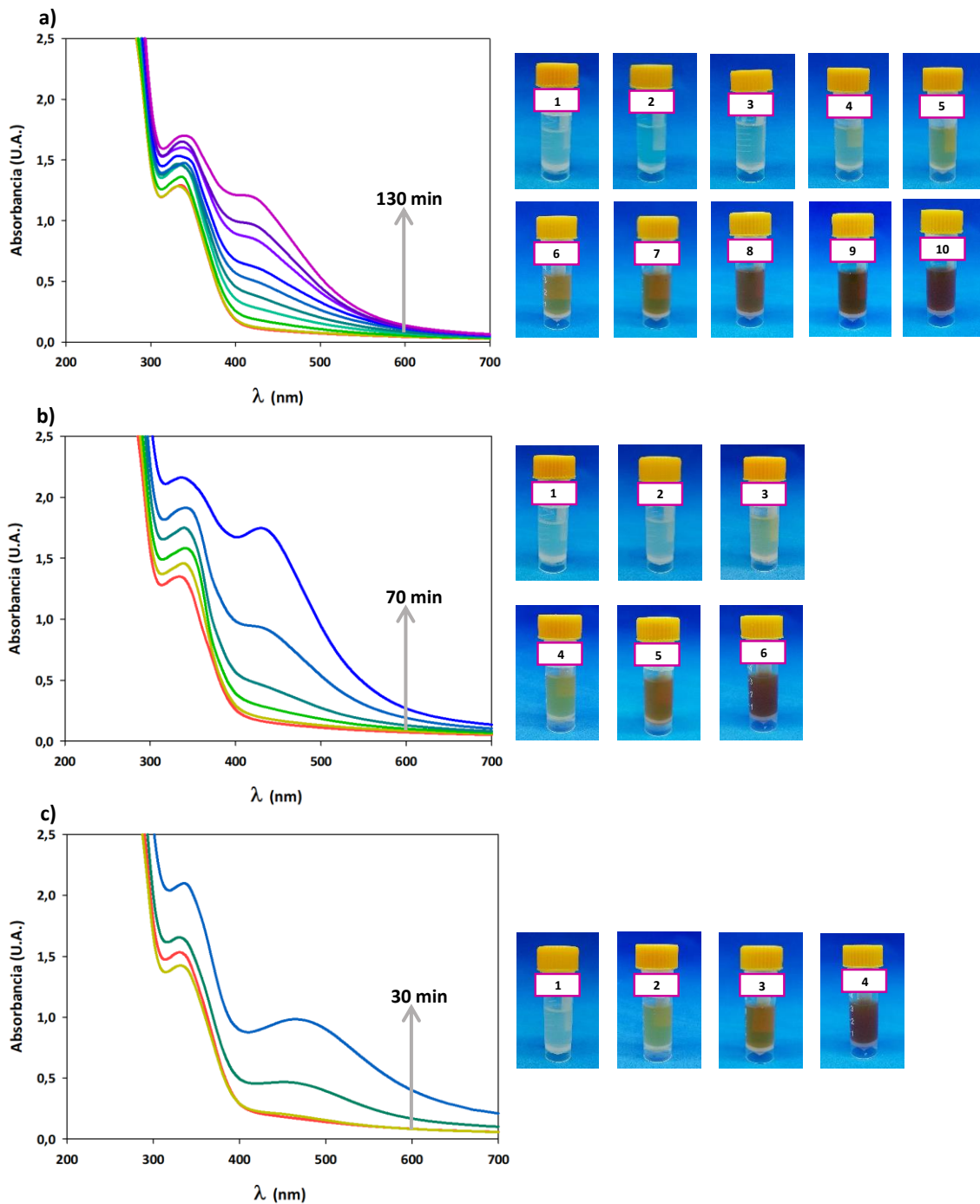


Figura 2.3: Evolución en función del tiempo de reacción de los espectros de absorción UV-visible de las AgNP L sintetizadas a diferentes temperaturas, a) 45 °C; b) 67,5 °C y c) 90 °C. Se incluyen las fotografías de las soluciones conteniendo las AgNP L analizadas.

Con respecto a la formación de AgNP L, se propuso un mecanismo de crecimiento de cuatro pasos (Figura 2.4), en concordancia con lo sugerido por Polte y col. (2012) para la

síntesis de nanopartículas en presencia de un agente estabilizador estérico adicional, como la polivinilpirrolidona (PVP).

El primer paso corresponde a la reducción química inmediata del AgNO_3 por parte de los componentes presentes en el jugo de limón que pueden actuar como agentes reductores, principalmente ácido ascórbico y ácido cítrico además de otros compuestos como azúcares reductores, polifenoles y flavonoides, aunque estos en menor medida; una hipótesis similar fue argumentada por Mohapatra y col. (2015).

A continuación se produce el primer proceso coalescente, que conduce a un conjunto de partículas que tienen un radio medio inferior a 1 nm con una alta polidispersidad asociada (alrededor del 60 %). Basándose en mediciones de dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS), Polte y col. (2012) determinaron que el segundo paso ocurre dentro de los primeros 2 minutos de la síntesis, observándose la resonancia plasmónica asociada a 390 nm.

El tercer paso corresponde a un estado metaestable en donde las partículas alcanzan un radio medio de 1 nm. Este estado tiene una duración de unos 5 - 60 minutos (dependiendo de la temperatura de la síntesis), y en él no se detectó ningún cambio sustancial en los espectros UV-vis (Figura 2.5).

El paso final es la coalescencia de las partículas formadas, la cual se detiene cuando las nanopartículas alcanzan un tamaño en el que la estabilidad coloidal es suficiente para evitar la agregación de las mismas y una mayor coalescencia.

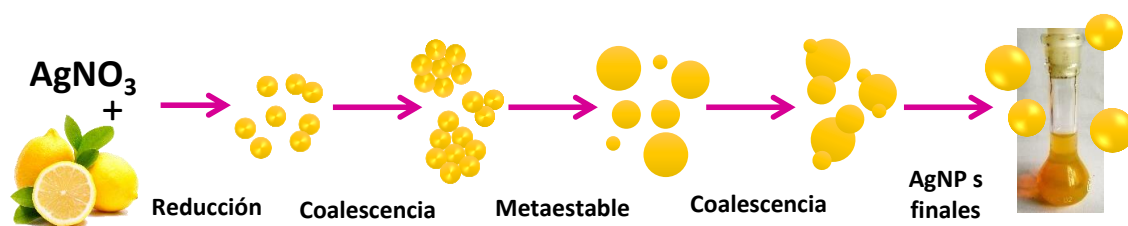


Figura 2.4: Esquema adaptado de Polte y col. (2012) para el mecanismo de formación de las AgNPs utilizando jugo de limón como agente reductor y de *capping*.

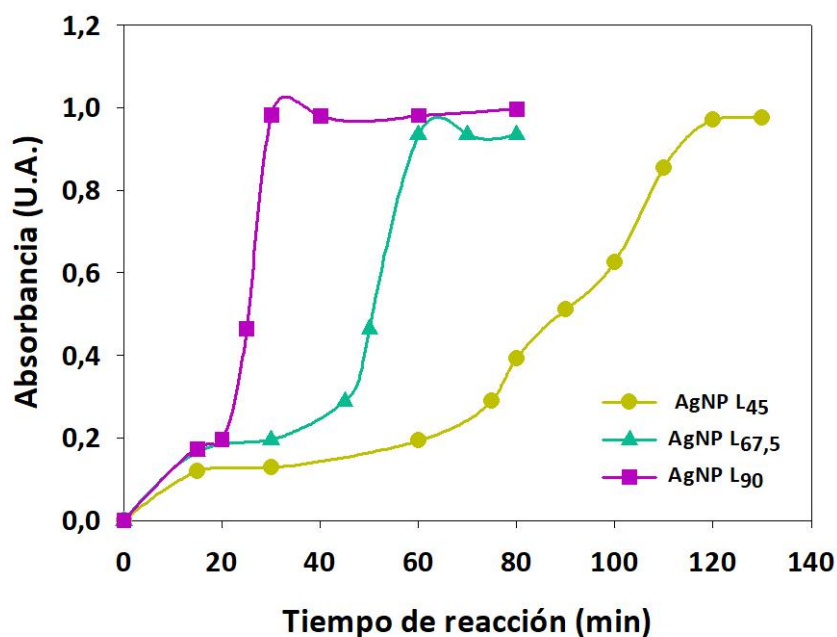


Figura 2.5: Cinética de la síntesis de las AgNP L a las diferentes temperaturas ensayadas.

Las nanopartículas obtenidas bajo las diferentes condiciones de temperatura ensayadas fueron visualizadas por TEM, presentando morfología esférica (Figura 2.6). Las imágenes se analizaron con el software Image J para determinar los diámetros individuales de las AgNP L, y con los datos obtenidos se construyó el histograma, analizando luego el diámetro medio de las partículas como la media de la distribución. Así, cuando las reacciones se llevaron a cabo a 45, 67,5 y 90 °C los tamaños medios fueron $7,7 \pm 1,7$ nm, $13,5 \pm 3,7$ nm y $5,5 \pm 0,8$ nm respectivamente. Con respecto a la polidispersidad en el tamaño de las NPs los valores obtenidos fueron 0,22, 0,274 y 0,145 para las síntesis realizadas a 45, 67,5 y 90 °C respectivamente. El valor más bajo de polidispersidad se obtuvo para la reacción que se realizó a 90 °C, lo cual revela la presencia de una suspensión conformada por partículas relativamente monodispersas y además refleja una mayor estabilidad en este sistema (Figura 2.6c). En el caso de las nanopartículas sintetizadas a 45 °C, fue evidente el fenómeno de agregación (Figura 2.6a), siendo este efecto menos marcado para las AgNP L sintetizadas a 67,5 °C (Figura 2.6 b).

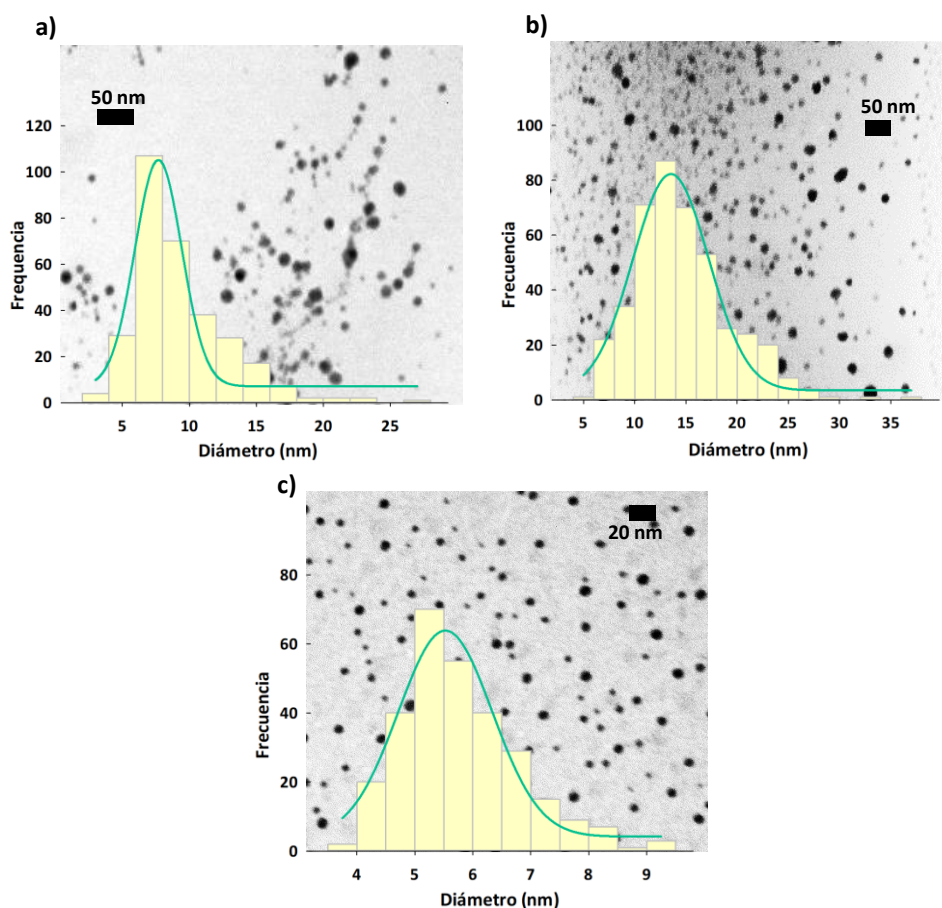


Figura 2.6: Micrografías de TEM de las AgNP L sintetizadas a diferentes temperaturas, a) 45 °C, b) 67,5 °C y c) 90 °C.

La estabilidad de las suspensiones coloidales obtenidas también se evaluó a través de medidas de potencial Z. Los valores alcanzados mediante esta técnica fueron $-7,6 \pm 0,9$ mV; $-8,4 \pm 1,1$ mV y $-10,8 \pm 1,6$ mV para las nanopartículas sintetizadas a 45; 67,5 y 90 °C, respectivamente. Los resultados reflejaron nuevamente que la estabilidad del sistema mejora cuando la reacción se desarrolla a una temperatura más elevada. Los valores bajos de potencial zeta obtenidos en relación con los encontrados en la literatura se atribuyeron a la baja concentración de AgNO_3 utilizada ($6,5 \cdot 10^{-3}\text{M}$), ya que, cuando se realizó el mismo ensayo a 90 °C y con una concentración mayor de sal de plata ($6,5 \cdot 10^{-2}\text{M}$), el valor alcanzado fue de $-29,5 \pm 2,7$ mV, el cual es similar al reportado por Prathna y col. (2011, 2014) para concentraciones de plata similares (-29 mV).

Por otro lado, los valores negativos obtenidos para la determinación de la carga superficial de las NPs confirman que, tanto los polifenoles, azúcares y demás

fitocompuestos mencionados junto con los ácidos cítrico y ascórbico presentes en el jugo de limón serían los responsables de la reducción y estabilización de las partículas. (Oberdörster, Oberdörster, y Oberdörster, 2005) trabajaron en la obtención de nanopartículas de oro con extractos cítricos y sugirieron que los grupos carbonilo de los ácidos orgánicos presentes (cítrico y ascórbico), pueden tener una gran capacidad de unión a iones metálicos, de modo que estos compuestos podrían formar una capa sobre la nanopartícula metálica (*capping*) la que evitaría su acumulación.

Considerando tanto los resultados mencionados anteriormente, como el tiempo requerido para la síntesis, se seleccionó la temperatura de 90 °C y 30 min como la opción más eficiente para obtener las AgNP L.

La estabilidad de las nanopartículas en las suspensiones coloidales es un factor significativo ya que, en muchas ocasiones tienden a formar aglomerados o agregados después de cierto tiempo. Los aglomerados son grupos de NPs unidas por fuerzas relativamente débiles como las de Van der Waals, o de tensión superficial las cuales pueden ser removidas fácilmente mediante acción mecánica, mientras que en los agregados las nanopartículas se encuentran fuertemente unidas electrostáticamente y su dispersión no es tan sencilla (Oberdörster y col., 2005). La Figura 2.7 muestra la evolución de los espectros UV-vis de suspensiones coloidales obtenidas a 90 °C durante 30 min y luego almacenadas a 4 °C y al resguardo de la luz. El seguimiento de la estabilidad durante 395 días indicó que la muestra permaneció estable durante 90 días, manteniendo su valor de potencial zeta ($-9,6 \pm 0,9$ mV) el cual no difirió significativamente ($p > 0,05$) del valor inicial, mencionado anteriormente. Luego de este tiempo se comenzó a registrar una disminución del plasmón. Aunque los estudios durante el almacenamiento de las nanopartículas de plata son limitados, los resultados coinciden con los obtenidos por Pinto y col. (2010), quienes observaron que la banda SPR de AgNPs almacenadas a 4 °C era estable debido a que la dispersión por parte de las nanopartículas más pequeñas, era reducida. Este es un resultado relevante, considerando la futura aplicación de las nanopartículas y más aún, que los estudios de estabilidad de las nanopartículas durante el almacenamiento son escasos (Albeladi, AL-Tabaiti, y Khan, 2020; Pinto y col., 2010).

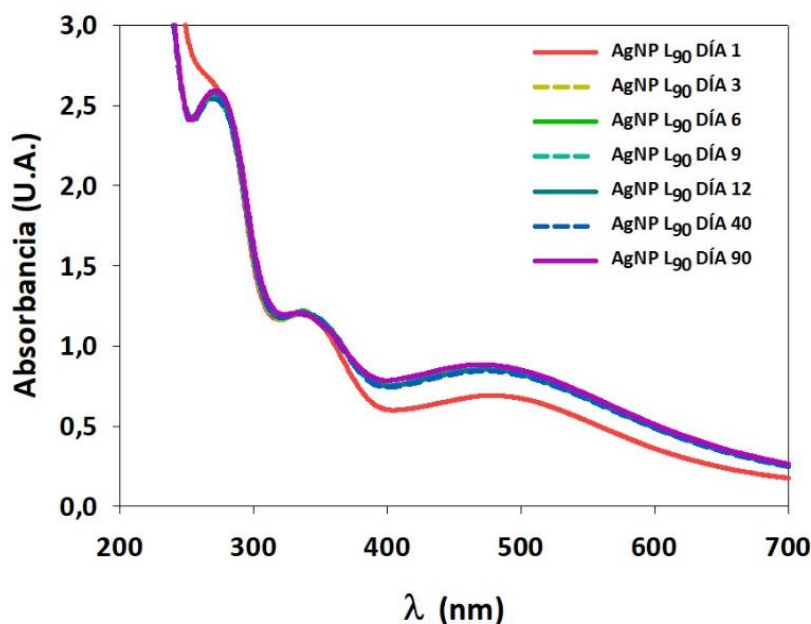


Figura 2.7: Evolución del espectro UV-visible de las AgNP L sintetizadas a 90 °C durante 90 días de almacenamiento.

La caracterización de las suspensiones coloidales de las AgNP L sintetizadas en las condiciones seleccionadas (30 min a 90 °C) se completó mediante ATR-FTIR. Figura 2.8 muestra el espectro FTIR de las AgNP L obtenidas, donde se puede ver la presencia de las bandas de estiramiento O–H (alrededor de $3294,3\text{ cm}^{-1}$) debido a los grupos OH provenientes mayoritariamente de la solución acuosa y el pico alrededor de $1635,7\text{ cm}^{-1}$ que puede atribuirse a los modos de flexión de los enlaces OH de los compuestos polifenólicos en el extracto; sin embargo, algunos autores reportan que en las cercanías de 1600 cm^{-1} podrían encontrarse las vibraciones aromáticas C=C, a la que contribuiría el flavonoide rutina y los carotenoides presentes en el jugo entre otros (Cruz y col., 2010; Prathna y col., 2011, 2014). Por último, según Cruz y col. (2010) las bandas en 1257 y 1153 cm^{-1} confirman la presencia de grupos C–O de los polioles presentes.

Al hacer la deconvolución del pico a $1635,7\text{ cm}^{-1}$ se pudo observar la presencia de la banda $1720,1\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al C=O del ácido cítrico (Reddy y Yang 2010; Seligra y col., 2016). También se han reportado en la bibliografía las bandas correspondientes al ácido ascórbico con distintos modos de flexión- estiramiento del enlace O–H alrededor de 3626 cm^{-1} , 3411 cm^{-1} y 3316 cm^{-1} y al estiramiento OH unido a H en

cercanías a 3025 cm^{-1} y 3218 cm^{-1} . El ácido cítrico, presenta la banda característica a 1720 cm^{-1} (Prathna y col., 2011); el solapamiento/disminución de esta banda sugiere que el ácido cítrico se encontraría comprometido actuando como agente de recubrimiento o *capping* en las AgNP L sintetizadas. Un resultado similar fue reportado por Prathna y col. (2011) comparando el espectro obtenido para las nanopartículas de plata con el correspondiente al del ácido cítrico y ascórbico, respectivamente. Los autores concluyeron que había una mayor correlación con el primero, lo que sugiere que las AgNPs estaban estabilizadas por el AC.

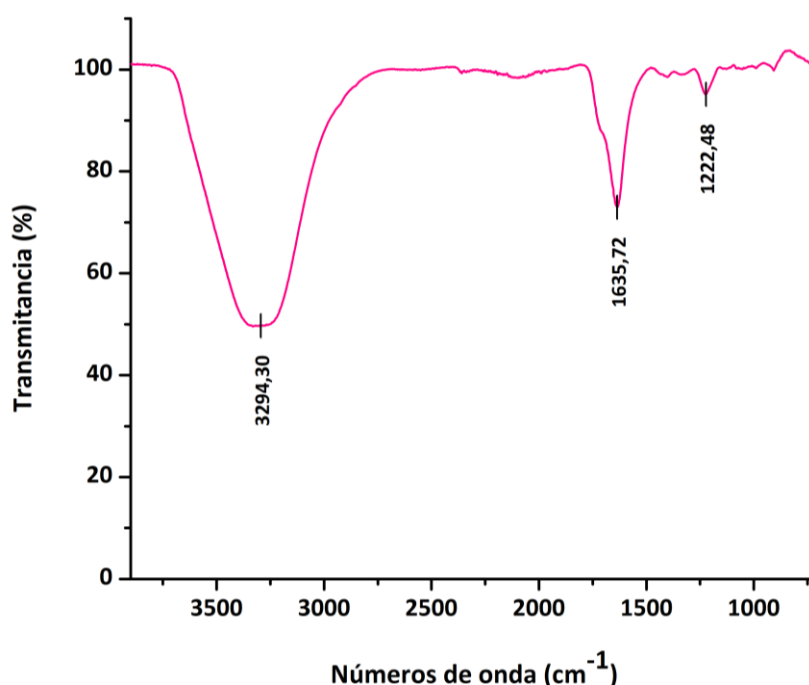


Figura 2.8: Espectro FTIR obtenido para la suspensión de AgNP L sintetizadas a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ - 30 min.

4.3. Películas nanocompuestas con incorporación de las AgNP L sintetizadas

En todos los casos fue posible obtener películas nanocompuestas por agregado de las AgNP L a las suspensiones filmogénicas de almidón. Se observó que tanto los materiales nanocompuestos como sus respectivos controles eran homogéneos y podían retirarse fácilmente de las placas utilizadas como moldes (Figura 2.9). Asimismo, la incorporación

de AgNP L no afectó su espesor y el contenido de humedad permaneció alrededor del 23 % (Tabla 2.2).

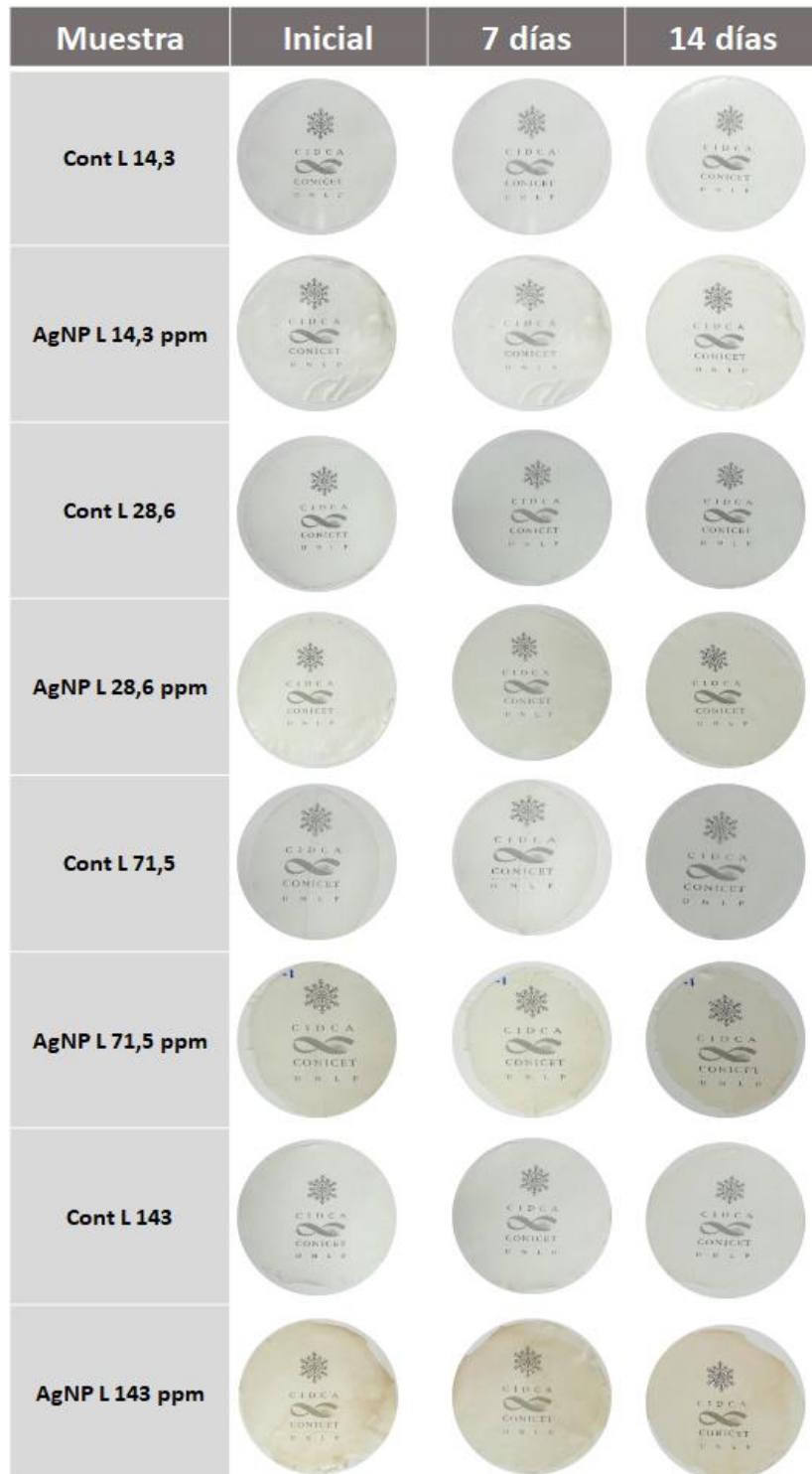


Figura 2.9: Fotografías de las películas control limón y nanocompuestas obtenidas por agregado de concentraciones crecientes de AgNP L.

Tabla 2.2: Espesor y contenido de humedad de las películas control limón y nanocompuestas obtenidas con agregado de concentraciones crecientes de AgNP L.

Muestra	Espesor (μm)	Contenido de Humedad (%)
Cont L 14,3	103,5 \pm 3,9 ^a	24,4 \pm 0,9 ^b
Cont L 28,6	101,6 \pm 3,7 ^a	23,1 \pm 0,2 ^{a,b}
Cont L 71,5	104,0 \pm 4,1 ^a	24,7 \pm 0,9 ^b
Cont L 143	103,5 \pm 4,3 ^a	22,2 \pm 0,4 ^a
AgNP L 14,3 ppm	100,0 \pm 3,9 ^a	23,9 \pm 0,6 ^{a,b}
AgNP L 28,6 ppm	101,1 \pm 4,1 ^a	24,5 \pm 0,6 ^b
AgNP L 71,5 ppm	102,7 \pm 3,9 ^a	23,2 \pm 1,7 ^{a,b}
AgNP L 143 ppm	101,4 \pm 4,1 ^a	22,0 \pm 1,0 ^a

Se informan los valores medios \pm la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.1. Propiedades ópticas: color superficial y capacidad de barrera al UV

Se realizó un análisis visual de las películas control y se encontró que estas presentaban un tono ligeramente amarillento, el cual se intensificó con el contenido de jugo de limón agregado (Figura 2.9), coincidiendo con el aumento en los valores del parámetro de cromaticidad b^* (Figura 2.10a). Este débil tono amarillo se atribuyó a la presencia de carotenoides que se encuentran en el jugo de limón. Cuando se incorporaron las nanopartículas al material, su coloración se incrementó, adoptando un tono ligeramente anaranjado. El agregado de nanopartículas disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la luminosidad (L^*) de las películas respecto al control, siendo este efecto dependiente del contenido de AgNP L. El mismo comportamiento se observó en el Capítulo 1 (Sección 4.3.2) al incrementar la concentración de AgNPs *in situ* en la matriz filmogénica. Asimismo, Polat, Fenercioğlu, y Güçlü, (2018) registraron una tendencia similar al estudiar la incorporación de AgNPs y ZnO NPs en películas de polietileno de baja densidad, observando una disminución de L^* de 96,72 a 76,60 y de 96,72 a 94,83 para los matrices con AgNPs o ZnO NPs, respectivamente.

En cuanto a los parámetros de cromaticidad, a^* pasó de valores negativos a positivos, mientras que b^* aumentó muy significativamente ($p < 0,01$), coincidiendo con el aumento en el tono ligeramente anaranjado de las películas (Figura 2.10a). Estos resultados se atribuyeron al plasmón de resonancia superficial de las AgNPs que exhiben absorción en la región visible (400 - 420 nm), (Figura 2.3). Como consecuencia, el aumento en la diferencia de color (ΔE) fue más evidente para las películas nanocompuestas como se puede observar en la Figura 2.10b. Una tendencia similar fue informada por Wang y col. (2020) trabajando con películas de nanocelulosa bacteriana-PVA conteniendo nanopartículas de plata.

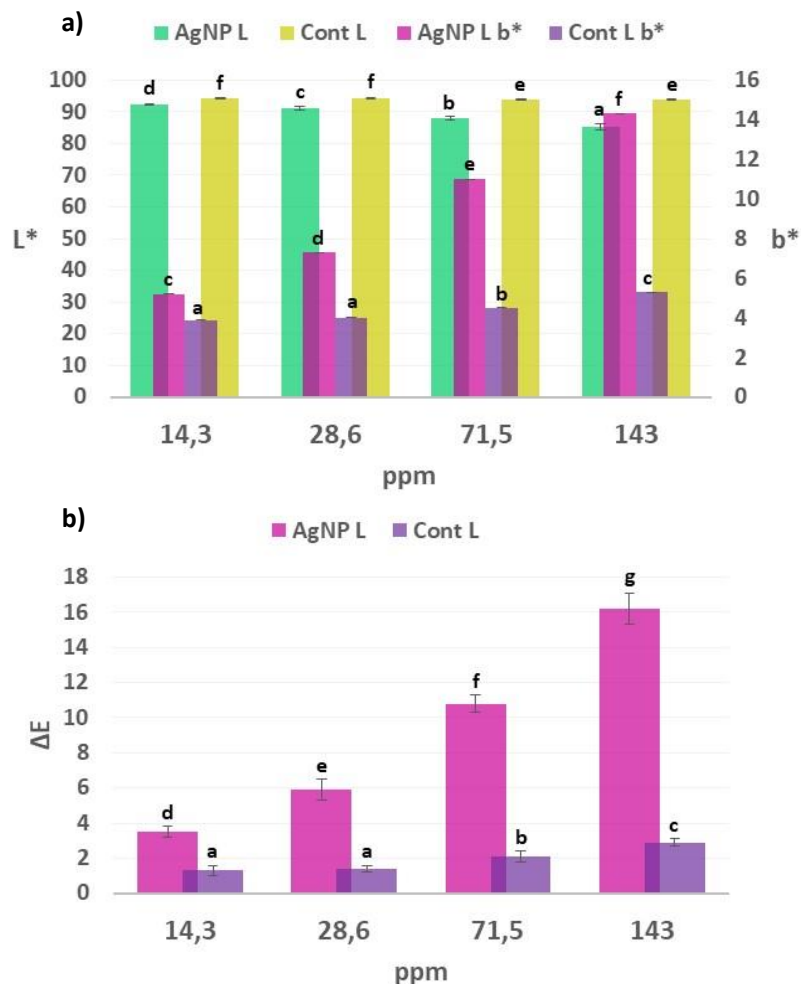


Figura 2.10: Parámetros ópticos L^* y b^* (a), y diferencia de color (ΔE) (b) de las películas de almidón de maíz control y con el agregado de diferentes concentraciones de AgNP L.

Durante el almacenamiento de las muestras bajo condiciones controladas, el color de las películas se intensificó ligeramente, siendo este efecto más evidente en los sistemas nanocompuestos (Figura 2.11). Rhim y col. (2013) encontraron el mismo efecto en películas de agar con AgNPs. Si bien el plasmón de la solución coloidal de AgNP L se mantuvo estable en el tiempo (Figura 2.7), los resultados obtenidos podrían atribuirse a modificaciones sufridas por los componentes activos en el jugo de limón, principalmente polifenoles y flavonoides. Además, es importante señalar que las diferencias de color aumentaron solo 0,5 y 2 unidades en el caso de los controles y películas nanocompuestas conteniendo 143 ppm de AgNP L después de 14 días de almacenamiento, siendo estas diferencias apenas detectables visualmente (Figura 2.9).

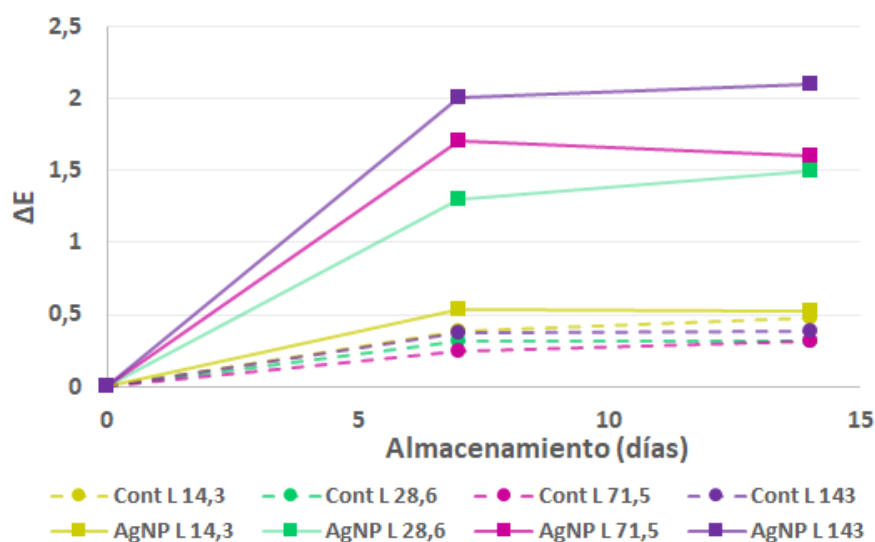


Figura 2.11: Diferencias de color de las películas control y nanocompuestas almacenadas durante 14 días.

Por otra parte, los alimentos pueden verse afectados negativamente debido a una exposición prolongada a la luz ya que ésta puede causar un considerable deterioro de la calidad, como por ejemplo, la pérdida de vitaminas, cambios en las propiedades sensoriales y en la vida útil. Además, la exposición de los alimentos a la luz ultravioleta puede iniciar reacciones de oxidación. La sensibilidad a la luz es una propiedad muy específica de cada alimento y puede variar según las longitudes de onda de la luz, y el método de procesamiento. En el caso de las carnes frescas se sabe que se decoloran

rápidamente cuando se exponen a la luz UV, pero son resistentes a la luz visible. Sin embargo, las carnes conservadas con nitrito o nitrato sufren decoloración tanto a la luz visible como a la ultravioleta. Otro ejemplo son la riboflavina, el ácido ascórbico y los pigmentos que también son fotosensibles; es por eso que debe prestarse mucha atención al seleccionar los materiales a utilizar en los sistemas de envasado (Karel y Lund, 2003).

Con respecto a la capacidad de barrera al UV de las películas control, debido a que el jugo de limón contiene flavonoides y compuestos fenólicos, se vio un incremento de este parámetro con el contenido de jugo agregado (Figura 2.12). En las películas nanocompuestas, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en esta capacidad para concentraciones de AgNP L superiores a 28,6 ppm. Un ensayo realizado sobre películas sintéticas de LDPE con diferentes concentraciones de AgNPs y nanopartículas de ZnO, mostró un resultado similar, ya que se incrementó el bloqueo de los rayos UV con el contenido de NPs, siendo mayor el efecto con nanopartículas de ZnO (Polat y col., 2018). En general, las películas nanocompuestas fueron más opacas, principalmente porque las AgNPs L presentan la capacidad de poder bloquear la trayectoria de la luz, siendo este efecto evidente para concentraciones superiores a 28,6 ppm. Estos resultados coinciden con la evolución del parámetro de luminosidad descrita previamente (Figura 2.10a). De todos modos, esta opacidad no afectaría su posible aplicación como envases para alimentos, ya que, como se observa en la Figura 2.8 la imagen debajo de la película se sigue viendo nítida. Así, si se utilizaran en el diseño de un envase estos materiales nanocompuestos le permitirían al consumidor ver la calidad y frescura del producto envasado.

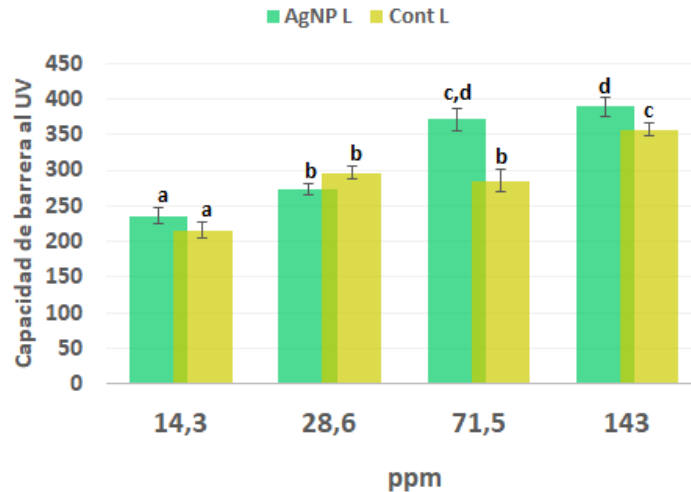


Figura 2.12: Capacidad de barrera al UV para películas de almidón de maíz con AgNP Ls en concentración 14,3; 28,6; 71,5 y 143 ppm y películas control.

4.3.2. Solubilidad en agua a 25 y 100 °C

En la Tabla 2.3 se muestran los valores de solubilidad de las películas tanto a temperatura ambiente como a 100 °C. Cuando el ensayo se llevó a cabo a 25 °C, no se observó un efecto significativo ($p > 0,05$) sobre la solubilidad de las películas control debido a la incorporación de jugo de limón hasta que se alcanzó un contenido equivalente a 71,5 ppm; este parámetro se mantuvo en aproximadamente un 36 %. La adición de jugo en la concentración equivalente a 143 ppm hace que las películas control se vuelvan ligeramente más solubles probablemente por la acción hidrolizante del ácido cítrico sobre las cadenas de almidón (en las suspensiones el pH varió entre pH 2 - 4). Ghanbarzadeh y col. (2011), estudiando el efecto de diferentes concentraciones de ácido cítrico sobre películas de almidón, establecieron que los grupos carboxilo del AC pueden formar puentes de hidrógeno fuertes con los grupos hidroxilo del almidón, y así mejorar las interacciones entre las moléculas, disminuyendo la sensibilidad al agua. Sin embargo, un exceso de AC puede no interactuar con las cadenas de los constituyentes del almidón, pero sí hacerlo con las moléculas de agua afectando las interacciones de esta por puente de hidrógeno con la matriz polimérica. De esta forma se reduce la cohesividad de la matriz de almidón y como resultado aumenta su solubilidad en agua.

Para las muestras nanocompuestas la tendencia no es clara, las películas en general presentan los mismos valores de solubilidad (28,6 y 143 ppm) o son levemente más altos (14,3 y 71,5 ppm) que los controles. Aunque el procedimiento seguido en el presente trabajo de Tesis para determinar la solubilidad de la película se usa comúnmente para materiales biodegradables, las limitaciones que presenta la técnica conlleva a la existencia de ciertos errores inherentes a la misma (como la recuperación del material no solubilizado).

Cuando se elevó la temperatura del medio de solubilización se observó el efecto esperado, las películas control fueron en promedio un 36 % soluble a 25 °C y 39 % a 100 °C. Mientras que para los materiales nanocompuestos la solubilidad promedio fue de 40 % a 25 °C y 47 % a 100 °C. Una tendencia similar se observó en el Capítulo 1 Sección 4.3.4 para películas nanocompuestas que contenían las mismas concentraciones de AgNPs sintetizadas *in situ*, en donde las películas fueron 31 % y 45 % solubles a 25 °C y 100 °C, respectivamente.

Tabla 2.3: Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y solubilidad en agua de las películas de almidón control y con agregado de diferentes concentraciones de AgNP L.

Muestra	Solubilidad (%)		WVP (10 ⁻¹⁰ g/m s Pa)
	25 °C	100 °C	
Cont L 14,3	35,3 ± 0,2 ^b	39,9 ± 4,2 ^{a,b}	1,60 ± 0,20 ^e
Cont L 28,6	34,6 ± 0,4 ^a	37,7 ± 0,8 ^a	1,62 ± 0,08 ^e
Cont L 71,5	35,1 ± 2,8 ^{a,b}	36,6 ± 2,6 ^a	1,53 ± 0,20 ^e
Cont L 143	38,2 ± 0,2 ^c	42,9 ± 0,4 ^b	0,99 ± 0,08 ^c
AgNP L 14,3 ppm	46,0 ± 1,3 ^e	54,7 ± 0,1 ^d	1,10 ± 0,09 ^{c,d}
AgNP L 28,6 ppm	35,9 ± 1,7 ^{a,b}	42,5 ± 3,6 ^{b,c}	0,75 ± 0,01 ^b
AgNP L 71,5 ppm	40,9 ± 0,6 ^d	45,6 ± 1,8 ^{b,c}	0,63 ± 0,07 ^a
AgNP L 143 ppm	38,7 ± 0,3 ^c	46,0 ± 0,7 ^{b,c}	1,20 ± 0,30 ^d

Se informan los valores medios ± la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.3. Propiedades de barrera al vapor de agua

El efecto de la incorporación de las nanopartículas de plata sobre la permeabilidad al vapor de agua de las películas formuladas a base de almidón de maíz se muestra en la Tabla 2.3. En los controles, la permeabilidad se mantuvo constante hasta un agregado de jugo de limón equivalente a la formulación con 71,5 ppm de AgNP L. En este caso, y considerando la acidez titulable del jugo, se estimó una adición de 3,47 g de ácido cítrico (AC) por cada 100 g de almidón. Las películas control correspondientes a la formulación con 143 ppm de AgNP L mostraron una permeabilidad al vapor de agua significativamente ($p < 0,05$) menor respecto al resto de los controles; en estas muestras, el contenido estimado de ácido cítrico que aporta el jugo de limón correspondería al 6,97 %. Se ha estudiado ampliamente que el ácido cítrico ejerce diferentes efectos sobre las formulaciones filmogénicas, dependiendo de su concentración: puede hidrolizar las cadenas poliméricas de los constituyentes del almidón (amilosa y amilopectina) y actuar como plastificante, reduciendo las interacciones entre estas cadenas poliméricas. Además, puede promover el entrecruzamiento de la matriz cuando el material es sometido a un tratamiento térmico de altas temperaturas, generalmente alrededor de 150 °C. Sin embargo, la reacción de entrecruzamiento entre el ácido cítrico y el almidón puede ocurrir a temperaturas más bajas, como 70 - 85 °C, aunque este efecto se da en menor medida (Menzel y col., 2013; Seligra y col., 2016). Considerando los posibles efectos mencionados, en las muestras control prevalecerá la hidrólisis de la matriz (pH de la suspensión filmogénica= 3,0), la cual se hace evidente al aumentar el contenido de ácido, y como resultado, habría un mejor empaquetamiento de las cadenas poliméricas más cortas, con la consiguiente modificación estructural que explicaría la disminución de la permeabilidad al vapor de agua del material. Varios autores han descrito este efecto del ácido cítrico sobre las matrices de almidón (Menzel y col. 2013; Seligra y col. 2016). Además, para que este efecto pueda ser evidente Shi y col. (2008) informaron que se requiere una concentración de ácido cítrico superior al 5 % (g AC por cada 100 g de biopolímero).

Por otro lado, en los materiales nanocompuestos se observó que el agregado de 71,5 ppm de AgNP L, disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la permeabilidad al vapor de agua con respecto a su control, debido al aumento en la tortuosidad de los caminos

que el vapor de agua debe seguir para atravesar la película (Tabla 2.3). Los resultados mencionados anteriormente indicaron un refuerzo de la matriz polimérica por parte de las nanopartículas, y coinciden con los hallazgos de Cheviron y col. (2015). Sin embargo, las muestras con un contenido de AgNP L de 143 ppm presentaron valores de permeabilidad al vapor de agua comparables a los de su control e incluso más altos que los de otros materiales nanocompuestos (Tabla 2.3). Una tendencia similar fue informada por Zhang y Jiang (2020) trabajando con películas de quitosano con nanopartículas de plata obtenidas mediante una síntesis verde mediada por los polifenoles presentes en té. El aumento en la concentración de AgNP L, no causaría un efecto tan importante en el retículo como se observa en las muestras control, e incluso podrían promover la generación de defectos en la matriz y, en consecuencia, aumentar la permeabilidad del material. Además, las películas nanocompuestas con 143 ppm de AgNP L contienen una mayor proporción de compuestos hidrofílicos correspondientes al jugo de limón, que conllevan a un incremento en el valor de permeabilidad al vapor de agua del material. Esta hipótesis también fue propuesta por Zhang y Jian (2020).

En relación a lo anteriormente expuesto diversos autores han señalado que en los materiales nanocompuestos con agregados de concentraciones bajas de plata, las cadenas macromoleculares que conforman la matriz se extenderían más con las especies de plata unidas, lo que conduciría a un aumento del factor de tortuosidad para la difusión de las moléculas de agua (Cano y col., 2016; Rhim y col., 2013). Por el contrario, mayores cantidades de plata inhibirían la extensión de las cadenas poliméricas en los medios acuosos, dando lugar luego del secado a una estructura de película menos compacta, donde las moléculas de agua pueden transferirse más rápidamente.

4.3.4. Propiedades mecánicas

Ya se mencionó la importancia que representan las propiedades mecánicas de un material a la hora de querer utilizarlo en el diseño de un envase para alimentos, y en el caso de las películas biodegradables se espera que tengan una resistencia adecuada y mantengan la integridad de los productos envasados durante la manipulación y almacenamiento.

La Figura 2.13a muestra el perfil mecánico (curvas de tensión-deformación) de las películas nanocompuestas y sus respectivos controles para las concentraciones de 14,3 y 71,5 ppm de AgNP L. Con respecto al efecto de la incorporación de jugo de limón en la suspensión filmogénica (muestras control), diferentes autores sugieren que la adición de hasta un 5 % de ácido cítrico conduce a una mejora en el refuerzo de las películas debido a que este ácido orgánico induce el entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas, incluso a bajas temperaturas (90 °C) (Seligra y col. 2016, Shi y col. 2008), como ya se mencionó. Esta tendencia se evidenció por la evolución del esfuerzo en las películas control (Figura 2.13b), y, se observó un refuerzo asociado al entrecruzamiento de la matriz para las muestras control que contenían el equivalente a 71,5 ppm de AgNP L (con 3,47 % AC, este contenido se calculó considerando la cantidad de jugo de limón agregado y su acidez titulable, como ya se mencionó). A continuación, se registró una disminución significativa ($p < 0,05$) en esta característica mecánica para los controles correspondientes a 143 ppm (que contenían 6,97 % de AC). Este efecto puede deberse al hecho que, el exceso de ácido cítrico en la matriz polimérica actúa como un plastificante reduciendo las interacciones entre las macromoléculas. Resultados similares fueron informados por Shi y col. (2008) trabajando con películas de almidón de maíz-PVA conteniendo entre un 5 y un 30 % de AC. Sin embargo, no se observó la mejora esperada en la flexibilidad de las películas control por la acción plastificante del AC (Figura 2.13c), probablemente debido a la baja concentración agregada.

Con respecto a la incorporación de las AgNP L a las películas de almidón de maíz, el efecto típico de refuerzo por parte de la adición de nanopartículas se observó hasta la concentración de 71,5 ppm mostrando valores de esfuerzo mayores a los de las películas control correspondientes (Figura 2.13b), lo cual concuerda con los datos aportados por otros autores (Chevion y col., 2015; W. Zhang y Jiang, 2020). Estos resultados también coinciden con los descritos en el Capítulo 1 Sección 4.3.5 donde se estudió el efecto de la síntesis *in situ* de AgNP a las mismas concentraciones que las utilizadas en este Capítulo. Por lo tanto, independientemente de la técnica de síntesis de NPs aplicada, y el hecho de que se generen *in situ* o se agreguen a la formulación, fue posible verificar el efecto del refuerzo de la matriz.

En general, la evolución de los parámetros de módulo elástico y trabajo mecánico fue similar al obtenido para el esfuerzo (Figura 2.13b); asimismo, la elongación a la ruptura no se vio afectada por la adición de AgNP L (Figura 2.13c). Se observó que con la incorporación de 143 ppm de AgNP L, había una disminución significativa ($p < 0,05$) en el esfuerzo y el consiguiente incremento en la elongación (Figuras 2.13b y c). Cano y col. (2016) reportaron un comportamiento similar trabajando en películas de almidón y PVA con nanopartículas de plata obtenidas mediante una síntesis física con luz UV. El refuerzo de la matriz se evidenció tanto por el aumento en el módulo elástico como en el esfuerzo, así como por la disminución de la elongación a la ruptura por incorporación de AgNPs en concentraciones de hasta 85,6 ppm. El agregado de concentraciones más elevadas de nanopartículas condujo a un detrimento de las propiedades mecánicas. Considerando la formulación de películas nanocompuestas con 85,6 ppm de AgNPs, Cano y col. (2016) registraron un aumento del 52 % en el módulo elástico y del 14 % en los valores obtenidos para el esfuerzo, al mismo tiempo las películas se volvieron un 17 % menos extensible que los controles. Comparando estos datos con los obtenidos en el presente trabajo de Tesis, para películas conteniendo 71,5 ppm de AgNP L: tanto el módulo elástico como el esfuerzo aumentaron un 25 % mientras que la elongación no se vio afectada significativamente ($p > 0,05$). Los valores obtenidos son más bajos que los de las películas a base de almidón de poroto y PVA mencionados anteriormente (Cano y col., 2016).

El efecto observado sobre la incorporación de bajas concentraciones de nanopartículas en películas a base de biopolímeros, podría atribuirse a la adsorción de las NPs en las cadenas poliméricas, y su interacción a través de las fuerzas de van der Waals, como lo propuso Rhim y col. (2013) y Shameli y col. (2010). Sin embargo, altas concentraciones, como subrayó Cano y col. (2016), podrían generar una posible sobresaturación de los puntos activos de la red polimérica por la adsorción de nanopartículas, conduciendo a una reducción de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas, y a causa de esto se obtendrían películas más débiles.

Por lo tanto, las propiedades mecánicas de las películas nanocompuestas desarrolladas en este Capítulo se ven afectadas tanto por la acción del ácido cítrico proveniente del jugo de limón como por el agregado de nanopartículas de plata. Además, los resultados

de las propiedades mecánicas están de acuerdo con los datos de permeabilidad al vapor de agua descritos anteriormente en la Sección 4.3.3.

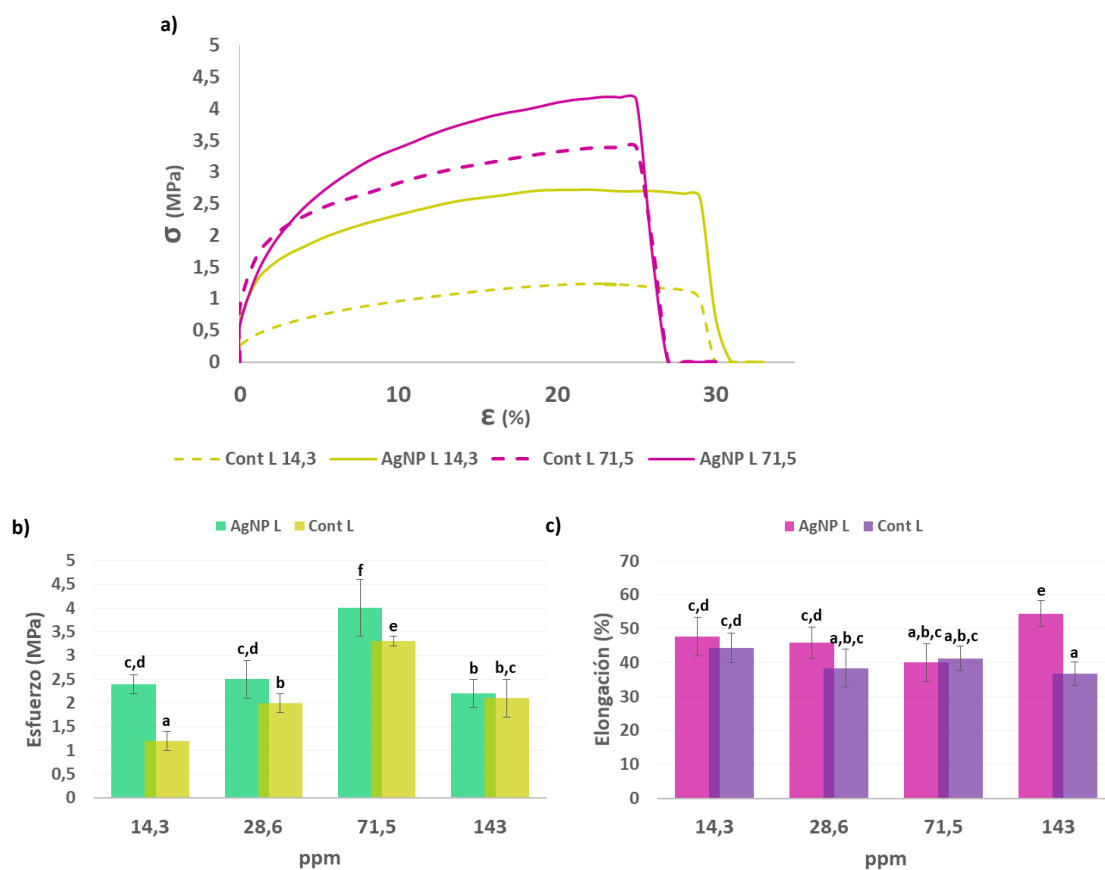


Figura 2.13: a) Curvas de esfuerzo (σ) - deformación (ϵ) para películas nanocompuestas y su respectivo control formuladas con 14,3 y 71,5 ppm de AgNP L. Evolución del esfuerzo b) y elongación a la ruptura c) de las películas control y nanocompuestas desarrolladas conteniendo diferentes concentraciones de AgNP L.

4.3.5. Capacidad de termosellado de los materiales desarrollados

El sellado térmico es otro factor crítico, junto con las propiedades de barrera y mecánicas, que va a determinar la posible aplicación del material nanocompuesto desarrollado como envase para alimentos. Un buen sellado debe ser lo suficientemente fuerte como para poder mantener el producto en el envase, y lo suficientemente

hermético como para mantener el producto fresco durante el tiempo de vida útil del mismo.

Todas las películas a base de almidón se termosellaron por la técnica de sellado por impulso, en la cual dos barras metálicas se calientan de manera intermitente por impulsos de una corriente eléctrica que pasa a través de un alambre que se encuentra dentro de una o ambas barras. La corriente calienta el alambre y éste lo conduce hacia los materiales que se sellan, debiendo los materiales permanecer un tiempo breve entre las barras para su enfriamiento.

Luego del sellado se evaluó el modo de falla de las películas. Para el control el modo de falla fue la delaminación, mientras que en el caso de las películas nanocompuestas se observó un modo mixto entre falla adhesiva y delaminación. Cuando se termosella una muestra de almidón se alcanzan temperaturas de 120 °C. A esta temperatura y debido a la presencia de plastificante y bajo contenido de agua, puede formarse almidón termoplástico (TPS), que tiene como característica presentar un modo de falla adhesivo; por el contrario, cuando no hay formación de TPS, el modo de falla es por delaminación. Cho y col. (2007) indicaron que se obtiene un cierre de buena calidad cuando la interacción molecular entre capas individuales es suficiente como para destruir la interfase y conducir a la formación de una nueva capa homogénea. La Figura 2.14 muestra el perfil mecánico típico obtenido de los ensayos de resistencia del termosellado. La resistencia máxima a la tracción y la energía necesaria para causar la falla (área bajo la curva) del termosellado fueron similares, tanto para las películas control como para las nanocompuestas, ya que los valores obtenidos no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$). Sin embargo, la resistencia a la tracción media de las películas nanocompuestas fue significativamente ($p < 0,05$) más alta que la de las muestras control, lo que podría atribuirse al refuerzo de la matriz de almidón por parte de las nanopartículas. Otros autores informaron una mejora de la capacidad de termosellado en películas de gelatina y almidón de papa con la incorporación de diferentes refuerzos nanométricos (Rouhi, Mahmud, Naderi, Raymond Ooi, y Mahmood, 2013; Sadegh-Hassani y Mohammadi Nafchi, 2014).

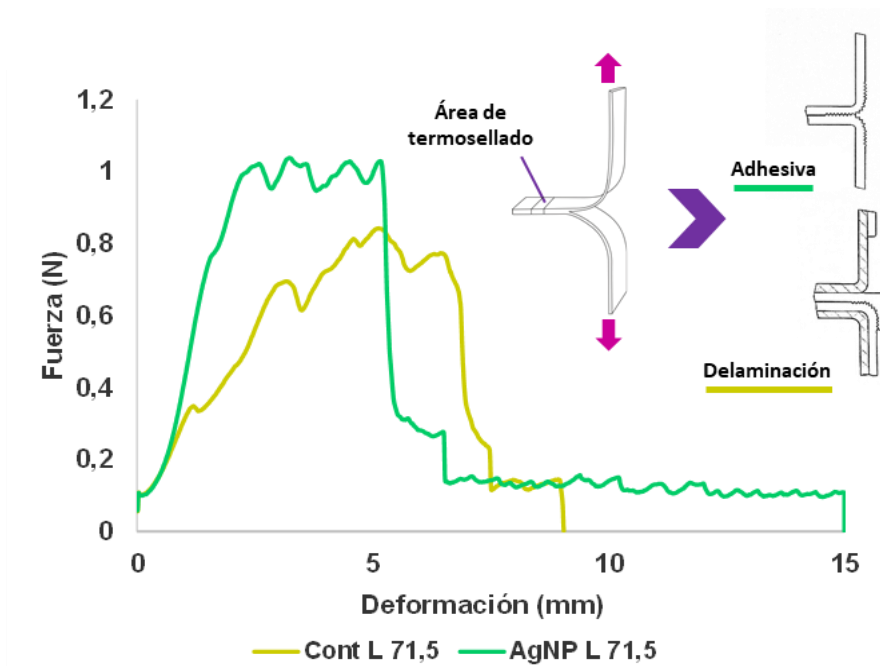


Figura 2.14: Curvas de resistencia al termosellado y los modos de falla asociados de películas con 71,5 ppm de AgNP L y su respectivo control.

4.3.6. Caracterización microestructural

A fin de relacionar los efectos del agregado de las AgNP L en las matrices de almidón, así como del jugo de limón en el caso de las películas control con la microestructura de los sistemas se realizó la caracterización a través de técnicas microscópicas (SEM), espectroscópicas (ATR-FTIR, Raman, difracción de rayos X) y de análisis térmico (MDSC).

4.3.6.1. Microscopía electrónica de barrido

Las micrografías de las películas desarrolladas en este Capítulo muestran superficies uniformes pero rugosas, independientemente de la adición de las NPs y su concentración (Figura 2.15). La rugosidad observada sería característica de los sistemas que incluían jugo de limón en su formulación ya que en el Capítulo 1 las películas tanto control como nanocompuestas con AgNPs sintetizadas *in situ* mostraron superficies lisas, uniformes y homogéneas (Figura 1.16). Nuevamente, no se detectó migración de glicerol a la superficie, dada su compatibilidad con la matriz. Los cortes transversales observados indicaron estructuras compactas y uniformes (Figura 2.15).

Cuando las muestras se sometieron a tracción fue posible observar la topografía superficial, y de los cortes transversales de las películas desarrolladas. En la Figura 2.15

se presentan las micrografías de las películas a base de almidón control conteniendo el reemplazo equivalente de jugo de limón y la película nanocompuesta con 71,5 ppm de AgNP L agregadas.

Se observaron grietas o microfisuras en la superficie del material en la dirección en la que se propagó la fractura de la probeta, siendo estas más importante en las muestras control (nótese que la magnificación de las micrografías es diferente a fin de ejemplificar lo observado). Se incluye en la Figura 2.15 un detalle de las microfisuras de la superficie de las películas analizadas. Esta morfología se corresponde con el comportamiento mecánico observado para este tipo de materiales (Figura 2.13) y evidencian nuevamente el refuerzo de la matriz por el agregado de las AgNP L. En este sentido, las películas nanocompuestas presentaron secciones transversales más compactas y una notoria disminución en el número de microfisuras; además no se percibe el patrón de alineación de las mismas en la dirección de la fractura de la probeta.

Así, las observaciones al SEM de las películas nanocompuestas ya sea conteniendo AgNPs sintetizadas in situ (Figura 1.18) como las desarrolladas en este Capítulo por agregado de nanopartículas sintetizadas con jugo de limón fueron capaces de reforzar las matrices de almidón, mejorando así sus propiedades mecánicas y al aumentar la tortuosidad sus propiedades de barrera al vapor de agua.

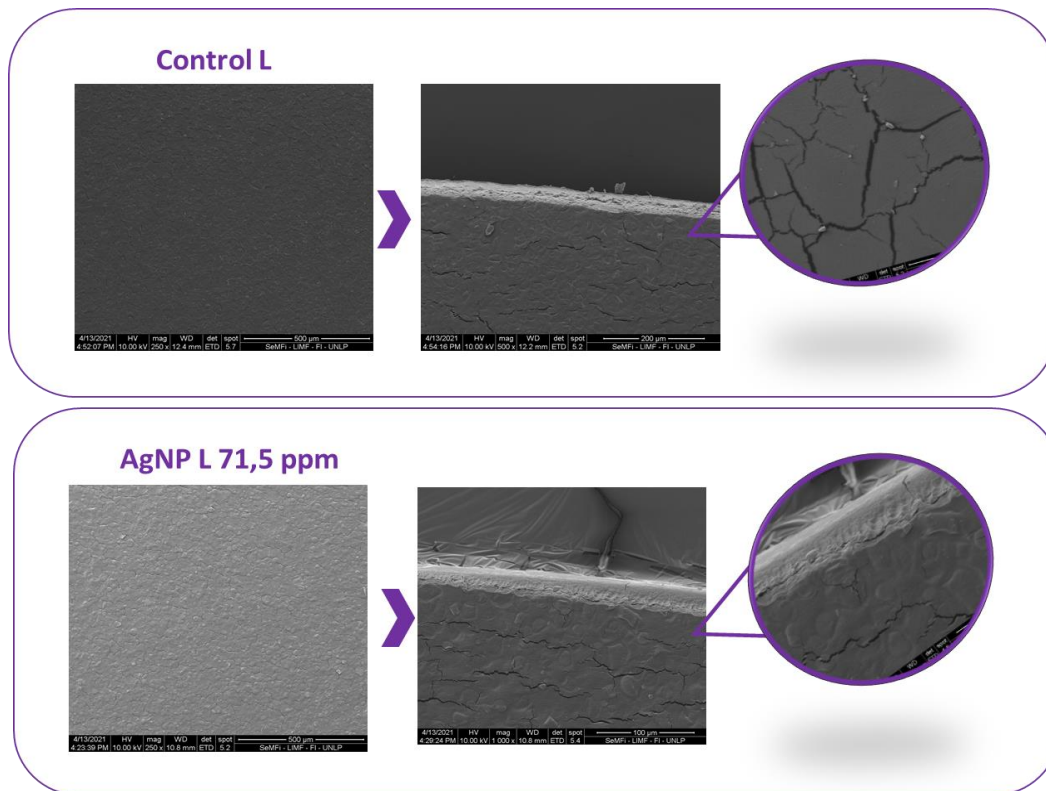


Figura 2.15: Micrografías electrónicas de barrido de películas control y con agregado de 71,5 ppm de AgNP L. Se presentan las superficies de las películas y la morfología de los cortes transversales de las muestras sometidas a ensayos de tracción, así como un detalle de los mismos. La magnificación utilizada se indica en las micrografías.

4.3.6.2. Análisis microestructural por ATR-FTIR

En los espectros de ATR-FTIR mostrados en la Figura 2.16 no se observan grandes diferencias en cuanto a la cantidad de bandas presentes en las películas de limón control y nanocompuestas respecto a las descritas en el Capítulo 1, excepto por una banda adicional a 1725 cm^{-1} , la cual comienza a ser visible, y se incrementa, para ambas muestras con la incorporación de jugo de limón o AgNP L. Este pico corresponde a las vibraciones de los enlaces C-O de los grupos carboxilo y éster carbonilo. Esta banda también fue observada por Reddy y Yang (2010) en películas de almidón con 5% de ácido cítrico como agente entrecruzante.

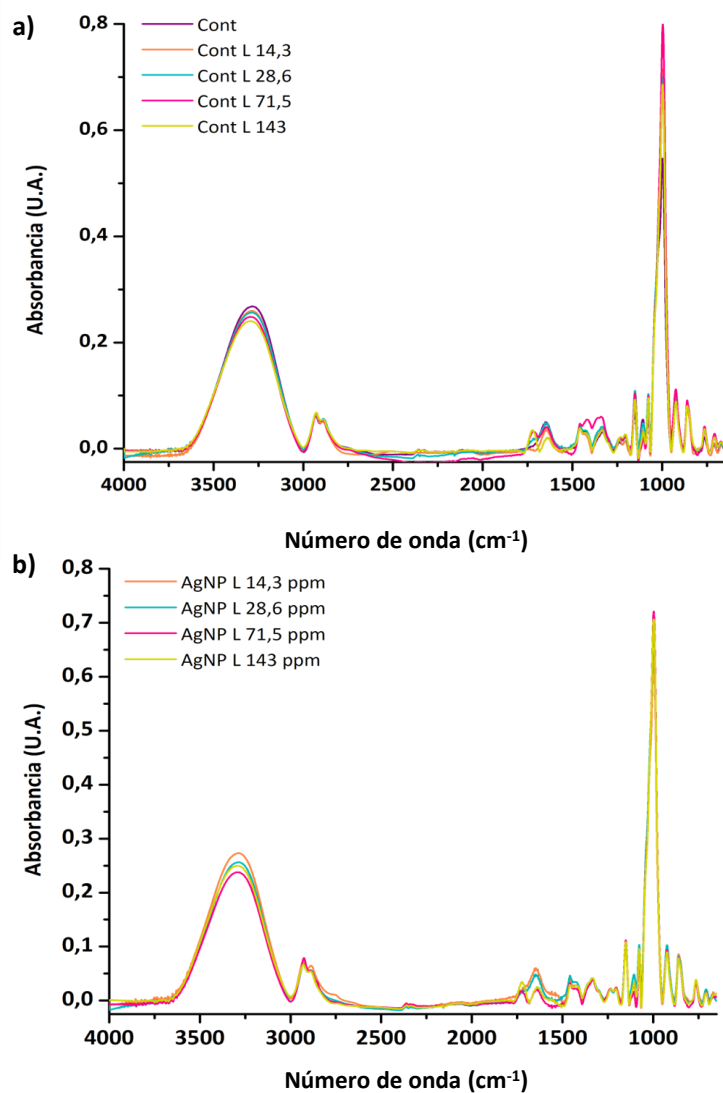


Figura 2.16: Espectros ATR-FTIR de películas control limón (a) y nanocompuestas con diferentes concentraciones de AgNP L agregadas (b).

En un trabajo realizado por Shi y col. (2008) en donde analizaron por separado los espectros FTIR del ácido cítrico y del almidón con incorporación de 30 % de glicerol observaron la ausencia de bandas a 1729 cm⁻¹, la cual sí era visible en la mezcla de los componentes mencionados. Por lo cual sugirieron que este pico corresponde al estiramiento vibracional del C=O debido al enlace éster y grupos carboxilo en el ácido cítrico, ya que es poco probable que todos los grupos carboxilo estén esterificados. Resultados similares fueron descritos en un trabajo posterior donde los autores profundizaron sus estudios (Shi y col., 2008). Por lo tanto, este cambio de posición entre los picos de los componentes en estado puro, respecto al obtenido en la mezcla

filmogénica, demuestra la formación de enlaces éster y el entrecruzamiento entre el ácido cítrico y el almidón.

Este análisis permite confirmar que ocurrió esterificación entre el almidón y el ácido cítrico del jugo de limón (con o sin nanopartículas), siendo esta característica distintiva ya que permite discriminar entre las películas control del Capítulo 1 y las utilizadas como control en este Capítulo.

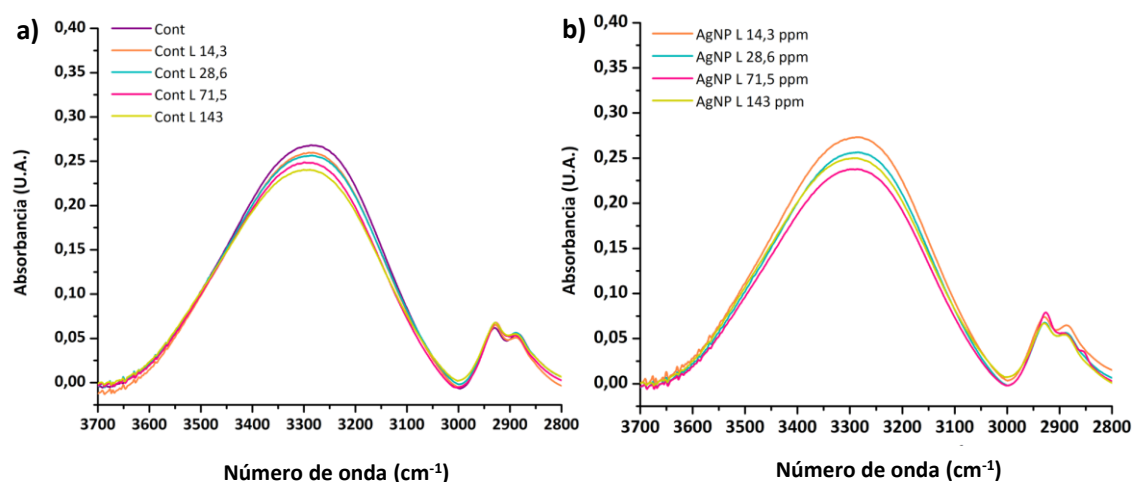


Figura 2.17: Región del espectro ATR-FTIR de 3700 a 2800 cm^{-1} para a) las diferentes películas control de limón, y b) sus respectivas películas nanocompuestas.

En la región comprendida entre 3700 y 2800 cm^{-1} (Figura 2.17a), la banda relacionada al estiramiento de los grupos OH (3300 cm^{-1}) pertenecientes al almidón, glicerol y agua de la matriz se volvió menos intensa con el incremento en el contenido de jugo de limón y presentó un corrimiento de $3285,6 \text{ cm}^{-1}$ a $3288,9 \text{ cm}^{-1}$ desde la película control sin agregado de jugo de limón (que se corresponde con el control del Capítulo 1) a la que contenía el equivalente a la concentración de 143 ppm (Cont L 143), lo cual indica que hay un número considerable de OH que se encuentran formando enlaces por puente de hidrógeno en las películas control. Un resultado similar presentan las muestras nanocompuestas, sin embargo la incorporación de 71,5 ppm de AgNP L lleva a una disminución en este pico (3290 cm^{-1}) (Figura 2.17b) indicando éstas que se pueden encontrar unidas a la matriz de la película por puentes de hidrógeno. Esto fue verificado

mediante la relación de intensidades $3300/1149\text{ cm}^{-1}$, la cual refleja la cantidad de OH disponibles (Seligra y col., 2016), siendo de 2,647; 2,351; 2,296 y 2,125 para las muestras con 14,3; 28,6, 143 y 71,5 ppm de AgNP L, respectivamente.

A continuación, en la Figura 2.18 se ve que hay una variación entre las bandas a $1600 - 1300\text{ cm}^{-1}$, las cuales comprenden la zona de interacción de los OH con el agua libre y ligada en las películas. Estas diferencias están asociadas con la presencia de grupos fenólicos y ácidos en el jugo de limón, entre otros, los cuales pueden interactuar con el agua mediante puentes de hidrógeno. En la región de la huella digital de los carbohidratos ($1200 - 800\text{ cm}^{-1}$), se evidencian las vibraciones de los enlaces C–O–C y C–O–H del anillo glucosídico. Las principales diferencias se observan en la banda a 995 cm^{-1} , correspondiente a la flexión C–O–H. Como ya se ha mencionado, existe una relación entre las intensidades de absorbancia relativas de los picos a $1045/1022$ o $1022/995\text{ cm}^{-1}$ y el grado de cristalinidad en muestras de almidón.

Las relaciones de las absorbancias mencionadas para los picos $1045/1022$ que se asocian a la contribución de las zonas cristalinas fueron de 0,512 y 0,516 para las películas Cont L 71,5 y AgNP L 71,5 ppm, respectivamente. Mientras que la relación de los picos $1022/995$ fue de 0,538 y 0,588 para las películas control y con AgNP L 71,5 ppm. Estos resultados sugieren que sería mayor la presencia de zonas amorfas, pero no se ven diferencias considerables entre las películas Cont L 71,5 y AgNP L 71,5 ppm. Sin embargo hay diferencias significativas al comparar los resultados de estas relaciones con los obtenidos en el Capítulo 1 para la película de almidón control siendo, 0,604 y 0,702 para $1045/1022$ y $1022/995$, respectivamente, lo cual implica una disminución en el grado de cristalinidad, principalmente por el efecto de adición de limón.

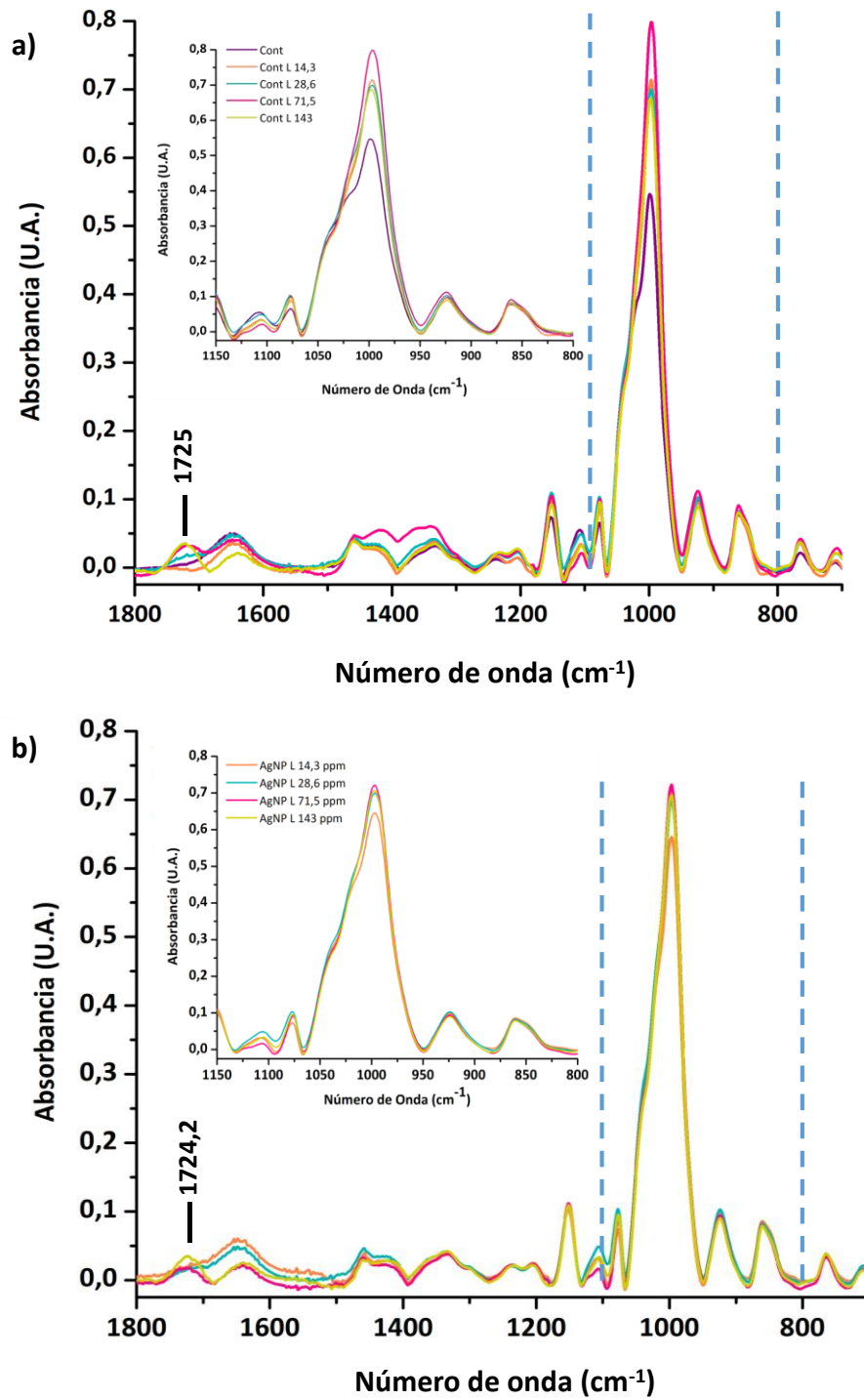


Figura 2.18: Espectros ATR-FTIR de películas de almidón control con limón (a) y conteniendo AgNP L (b) en diferentes concentraciones.

4.3.6.3. Difracción de rayos X

La Figura 2.19 muestra los difractogramas obtenidos para las películas de limón control y con AgNP L correspondientes a 71,5 ppm, ya que considerando los resultados presentados ha demostrado tener las mejores propiedades en relación al resto de las concentraciones analizadas. Estos films se compararon con la película de almidón al 3 % (control).

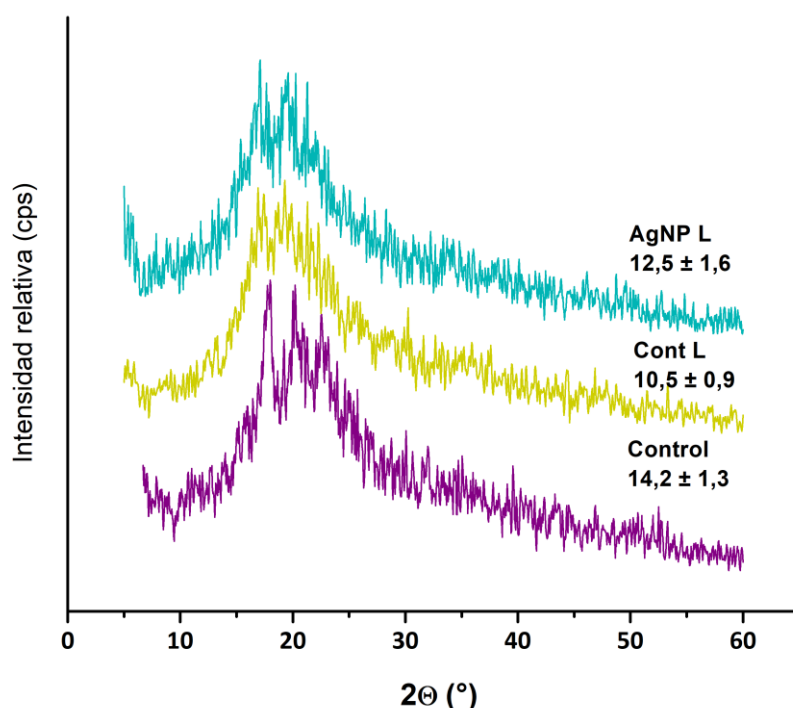


Figura 2.19: Difractogramas de la películas de almidón control y de las obtenidas en este Capítulo con el agregado de jugo de limón equivalente a la concentración de 71,5 ppm (Cont L) y nanocompuestas con agregado de 71,5 ppm de AgNP L.

Para la muestra control limón, la incorporación de jugo (3,74 % de ácido cítrico para esta concentración de 71,5 ppm) provocó una variación en el difractograma, más precisamente disminuyó la intensidad del pico a 19,1° en comparación con su contraparte del Capítulo 1 (control), y esto se vio reflejado en la disminución del grado de cristalinidad. Shi y col. (2008) quienes estudiaron el efecto de distintas concentraciones de ácido cítrico (5 - 30 % en peso) sobre las propiedades estructurales de películas de PVA/almidón, señalaron que tanto el efecto plastificante, como

entrecruzante del AC llevan a una disminución de la cristalinidad. Se ha postulado que la incorporación de AC afecta la cristalinidad de las películas a base de almidón genera entrecruzamientos en la matriz, rigidizando la estructura y desfavoreciendo la alineación de las cadenas poliméricas, si bien algunas de las zonas amorfas del almidón pueden haber quedado mejor orientadas después del entrecruzamiento (Shi y col., 2008; Reddy y Yang, 2010). Los resultados del GC de las películas control se correlacionan con los de las relaciones de absorbancia de ATR-FTIR de los picos 1045/1022 y 1022/995 previamente descritos.

Por otro lado, se puede ver que la inclusión de AgNP L a la matriz de almidón revierte parcialmente la acción del ácido cítrico ya que, se observa una mejor resolución de los picos del difractograma, particularmente del que se encuentra a 19° , seguido de un leve aumento en el grado de cristalinidad. Esto refuerza lo mencionado al analizar la propiedades mecánicas en la Sección 4.3.4 donde se señala que la incorporación de hasta un 5 % AC induce el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas y que hay un refuerzo en los materiales por incorporación de 71,5 ppm de AgNP L en comparación con su control. Hipótesis que se confirmó a través de los estudios por ATR-FTIR (Figura 2.18). Al igual que lo mencionado en el Capítulo 1, no fue posible visualizar los picos correspondientes a la Ag debido a la baja concentración de las AgNP L incorporada a las películas.

4.3.6.3. Caracterización de los materiales por MDSC

Tanto las películas control incluyendo jugo de limón como las nanocompuestas presentaron dos transiciones de segundo orden, lo que es típico de las películas de almidón plastificadas, como se describió en el Capítulo 1. La primera transición, Tg_1 atribuida a la fase rica en glicerol se localizó en las películas control conteniendo jugo de limón (Cont L 71,5 ppm) $-48,8 \pm 2,6^\circ\text{C}$ y la Tg_2 , atribuida a la fase rica en almidón, se observó a $55,6 \pm 3,4^\circ\text{C}$. Estos valores resultaron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) de los informados para las películas a base de almidón de maíz plastificadas con glicerol del Capítulo 1 ($Tg_1 = -58,6 \pm 1,9^\circ\text{C}$ y $Tg_2 = 45,8 \pm 1,6^\circ\text{C}$) mostrando que el agregado de jugo de jugo de limón (aún en estas pequeñas cantidades) afecta la microestructura del material. Así, se refuerza la decisión de considerar en este Capítulo el control

conteniendo la cantidad equivalente de jugo correspondiente a la concentración de AgNP L agregado.

Por su parte, en las películas nanocompuestas con agregado de 71,5 ppm de AgNP L la Tg_1 se localizó a $-46,4 \pm 0,2$ °C y la Tg_2 a $58,2 \pm 0,7$ °C, lo que indica que el efecto más importante en la matriz se debe a los componentes del jugo de limón, particularmente al ácido cítrico. Como en el Capítulo 1, se observó el inicio de un pico de fusión de la película a temperaturas cercanas a los 140°C el que no se pudo cuantificar con precisión debido a la pérdida de la hermeticidad de las cápsulas.

4.3.6.4. Caracterización de los materiales por espectroscopía Raman

Como ya se mencionó la técnica de espectroscopía Raman brinda información complementaria a la de ATR-FTIR, con la ventaja de estar libre de las interferencias debidas a bandas de agua, que en el caso de materiales hidrofílicos son importantes. Los espectros Raman obtenidos para las películas control y nanocompuestas, se muestran en la Figura 2.20a, como se puede observar presentan una gran similitud dada la pequeña cantidad de AgNP L presente en las películas nanocompuestas. En el espectro Raman correspondiente a estas últimas es posible apreciar una banda a 230 cm^{-1} que no se encuentra presente en la película control (Figura 2.20b), que pone en evidencia la presencia de AgNP L en la matriz. Varios autores han reportado que las bandas vibracionales Ag-O se dan en el rango de 230 y 248 cm^{-1} , respectivamente (Arboleda y col., 2018; Martina, Wiesinger, y Schreiner, 2012; Shadak Alee, Kuladeep, y Narayana Rao, 2013).

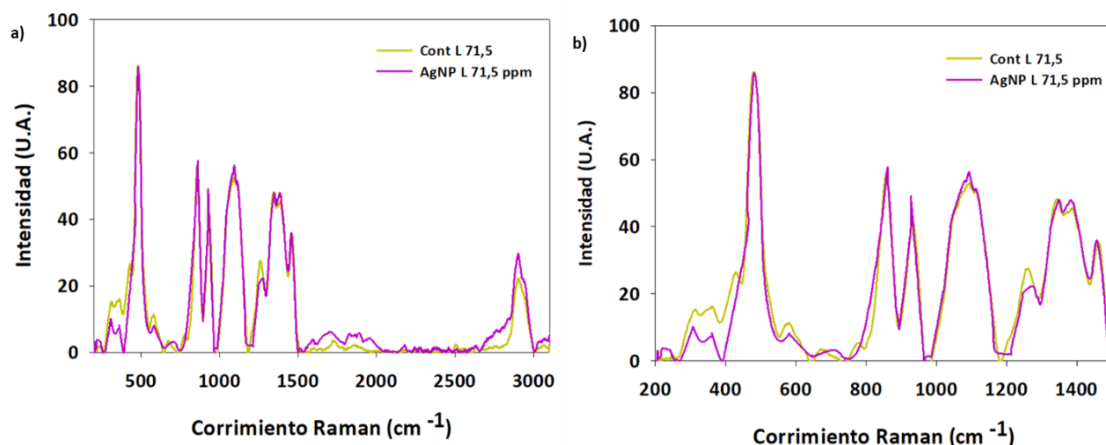


Figura 2.20: Espectros Raman de las películas control limón y con incorporación de AgNP L 71,5 ppm. a) Zona de 200 a 3100 cm^{-1} y b) zona 200 a 1500 cm^{-1} .

El almidón de maíz nativo ha sido caracterizado mediante espectroscopía Raman por diferentes autores (Fechner y col., 2005; Kizil, Irudayaraj, y Seetharaman, 2002), por lo tanto a partir de la literatura se pueden conocer las bandas correspondientes al polisacárido (Tabla 2.4). Para un mejor análisis suele dividirse el espectro Raman en cuatro regiones principales, por debajo de 800 cm^{-1} , $800\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ (la región de la huella dactilar), la región entre 2800 y 3000 cm^{-1} (región de estiramiento CH), y finalmente la región entre 3000 y 3600 cm^{-1} (OH región de estiramiento) (Kizil, Irudayaraj, y Seetharaman, 2002).

A partir de esta información se puede ver que los picos por debajo de 800 cm^{-1} (440 , 480 , 576 y 673 cm^{-1}) se atribuyen a las vibraciones en el esqueleto del anillo de piranosa en la unidad de glucosa de los almidones. En este punto es importante destacar que la banda a 440 cm^{-1} está ausente en el espectro de la película nanocompuesta, lo que podría indicar la interacción entre las AgNP L y el almidón. Además, la banda centrada a 480 cm^{-1} representa el grado de polimerización en los polisacáridos y es una de las formas de vibración del esqueleto del anillo de piranosa predominante y más importante. Esta banda pudo visualizarse tanto en la muestra control como en la nanocompuesta (Figura 2.30a y b).

Como se mencionó anteriormente el análisis del espectro Raman suele presentarse por zonas, en la región entre 800 y 1500 cm^{-1} , correspondiente a la huella dactilar, se

observan bandas características del almidón de maíz (Tabla 2.2). La región comprendida entre 1200-1500 cm^{-1} aporta información estructural, debido principalmente a la flexión y deformación del C-O-H. Particularmente en este caso puede observarse una sutil diferencia entre las películas estudiadas en la banda centrada a 1386 cm^{-1} , lo que puede atribuirse a la interacción entre las AgNP L y el almidón de la matriz. Por otro lado, se observa una diferencia entre ambos espectros en la región entre 2800 y 3000 cm^{-1} , mostrando de este modo una interacción entre las AgNP L y la matriz de almidón que forma la película nanocompuesta.

Tabla 2.4: Asignación de las bandas Raman más importantes de los almidones nativos según Fechner y col. (2005).

<i>Asignación</i>	<i>Posición de la banda (cm^{-1}) Almidón Nativo</i>
Modos esquelético del anillo de piranosa	441
	478
	576
	614
Deformación de CH y CH_2	866
Modo esquelético que involucra al enlace glicosídico α -1,4 (COC)	940
Deformación COH	1050
	1082
	1126
Cadena lateral CH_2O	1262
Giro CH_2 , flexión COH	1339
Tijereteo CH_2 , deformación CH y COH	1380
Deformación simétrica CH_2	1460
Modo de estiramiento CH	2910

4.3.7. Capacidad antimicrobiana

Teniendo en cuenta que los materiales desarrollados podrían utilizarse para el diseño de envases destinados a alimentos, se seleccionaron bacterias indicativas de buenas prácticas de manufactura (BPM) para evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas. En este sentido, dentro de las bacterias Gram-negativas, se evaluó *E. coli* como un indicador de prácticas de higiene deficientes, *Pseudomona aeruginosa* como un indicador de higiene general en el área de producción y *Salmonella spp.* como criterio de calidad obligatorio ya que este microorganismo debe estar ausente en los alimentos. También se analizó *S. aureus spp.*, una bacteria Gram-positiva que indica un manejo inadecuado de los alimentos debido a la mala higiene del operador. En general, se observó que las bacterias Gram negativas resultaron ser más sensibles que las Gram positivas (Tabla 2.5). Resultados similares fueron informados por otros autores (Cano y col. 2016; Zhang y Jiang 2020).

El microorganismo más sensible fue *Salmonella spp.* ya que se observó inhibición por contacto tanto en las películas control como en las nanocompuestas, y se observó la aparición de un halo de inhibición para concentraciones superiores a 28,6 ppm. La adición de AgNP L a las suspensiones filmogénicas permitió mejorar la capacidad antimicrobiana de las películas, registrando un aumento en el diámetro de los halos de inhibición en comparación con las muestras control de 16 y 11 % para concentraciones de 71,5 y 143 ppm respectivamente. En el caso de *E. coli* se registró un comportamiento similar, observándose que las nanopartículas aumentan el tamaño del halo de inhibición en un 14 % para los agregados de 143 ppm. Para *P. aeruginosa*, aunque hubo inhibición en todos los casos y se observaron halos a partir de las concentraciones mencionadas anteriormente, con el agregado de 71,5 ppm, se registró una disminución del 60 % en el tamaño del halo, mientras que cuando se duplicó esta concentración (143 ppm) el tamaño del halo aumentó un 75 % en relación a su respectivo control (Tabla 2.5). Ni los controles ni las películas nanocompuestas inhibieron la cepa de *S. aureus* a concentraciones equivalentes a 14.3 ppm. Cuando se aumentó el contenido, se observó inhibición en todas las películas nanocompuestas, mientras que en el caso de los controles, la inhibición por contacto se registró sólo a partir de 71,5 ppm. La presencia de halo de inhibición sólo se registró en películas que contenían 143 ppm de AgNP L.

Los resultados obtenidos pueden atribuirse, en el caso de las muestras control, a la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana *per se*, como son los compuestos terpénicos y flavonoides (Espina y col., 2011; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, y Pérez-Álvarez, 2008), así como a la disminución del pH de las suspensiones filmogénicas (varió entre pH 2 - 4). En las películas nanocompuestas, la capacidad antimicrobiana inherente de las nanopartículas de plata se agrega a los factores antes mencionados, ya demostrados en trabajos anteriores (Ortega y col., 2017, 2019). Las mismas concentraciones de AgNPs obtenidas a través de diferentes técnicas de síntesis verde se han utilizado en los trabajos mencionados anteriormente (descritos en el Capítulo 1 Sección 4.4) y para el desarrollo del presente Capítulo del trabajo de Tesis. Sin embargo, cuando las nanopartículas de plata son sintetizadas con jugo de limón, se evidenció un efecto sinérgico entre los compuestos activos presentes en el jugo cítrico y las AgNPs. Por lo tanto, en el caso de la síntesis *in situ*, solo se registró la inhibición por contacto para concentración de 71,5 ppm (Ortega y col. 2017), mientras que se registró la presencia de halo en el caso de la síntesis de nanopartículas con jugo de limón.

Con respecto a las concentraciones de nanopartículas de plata, Yoksan y Chirachanchai (2010) informaron que se observaron zonas de inhibición claras de más de 28 mm en películas de quitosano-almidón utilizando altas concentraciones de nanopartículas de plata de 0,07 a 0,29 % (p/p). Esto corresponde a concentraciones de 700 y 2900 ppm respectivamente, aunque en este caso deben considerarse los riesgos inherentes de toxicidad y que el quitosano *per se* presenta capacidad antimicrobiana.

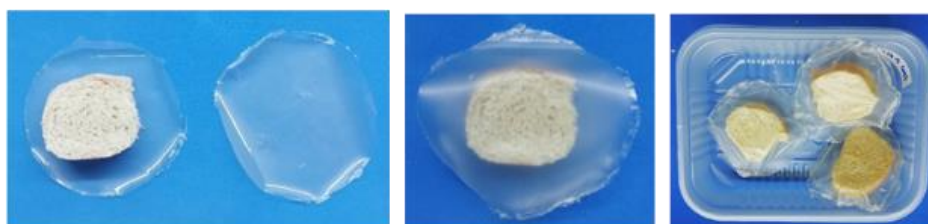
Tabla 2.5: Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas control y nanocompuestas con agregado de AgNP L en distintas concentraciones obtenidas en este Capítulo de Tesis.

Muestra	<i>Gram negativa</i>			<i>Gram positiva</i>
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomona</i>	<i>S. aureus</i>
Cont L 14,3	Contacto	Contacto	Contacto	Sin inhibición
Cont L 28,6	Contacto	Contacto	Contacto	Sin inhibición
Cont L 71,5	Halo 1,9 mm	Halo 11,0 mm	Halo 5,0 mm	Contacto
Cont L 143	Halo 19,0 mm	Halo 9,0 mm	Halo 4,0 mm	Contacto
AgNP L 14,3 ppm	Contacto	Contacto	Contacto	Sin inhibición
AgNP L 28,6 ppm	Contacto	Contacto	Contacto	Contacto
AgNP L 71,5 ppm	Halo 2,0 mm	Halo 12,8 mm	Halo 2,0 mm	Contacto
AgNP L 143 ppm	Halo 21,7 mm	Halo 10,0 mm	Halo 7,0 mm	Halo 6,5 mm

4.4. Aplicación de las películas desarrolladas como separadores de pan lacteado

Primeramente se realizó un ensayo donde las películas desarrolladas se utilizaron como envases primarios de rodajas de pan. A tal fin se obtuvieron bolsas por termosellado de las películas (Figura 2.21). Los envases desarrollados se almacenaron en las condiciones descritas en la Sección 3.7. Debido a la WVP de las muestras ($1,53$ y $0,63 \cdot 10^{-10}$ g/m s Pa para Cont L 71,5 y AgNP L 71,5 ppm, respectivamente) no fue posible mantener la actividad acuosa de los panes dentro del envase, observándose que los mismos perdieron rápidamente humedad y se endurecieron, lo que no permitió el desarrollo microbiano, siendo inviable la aplicación propuesta por los atributos de calidad del producto.

Preparación de las muestras para almacenamiento



Procesamiento del pan para el recuento, luego del almacenamiento

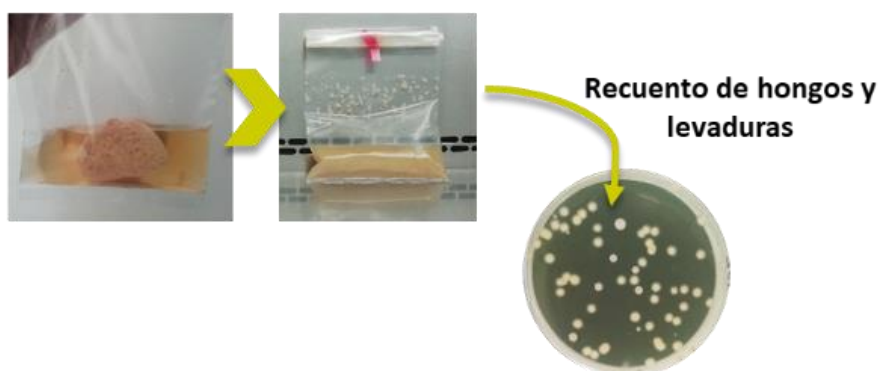


Figura 2.21: Evaluación de la aplicación de las películas desarrolladas como posibles envases para prolongar la vida útil de rebanadas de pan.

Se decidió entonces proponer su uso como separadores de rebanadas de pan lacteado. A tal fin, éstas se intercalaron con películas control de un film comercial (LDPE), películas nanocompuestas con 71,5 ppm de AgNP L y películas del control correspondiente (Cont L 71,5 ppm). A continuación se almacenaron a 20 °C durante 7 días y se realizó una inspección visual. Las imágenes registradas se observan en la Figura 2.22. Debido a la ausencia de conservantes en la formulación del pan, el desarrollo de microorganismos y hongos se observó muy temprano (después de 3 días de envasadas) para todas las muestras (Tabla 2.6), sin embargo el número de UFC/ mL fue menor para las películas Cont L 71,5 y AgNP L 71,5 ppm, sin obtener diferencias significativas entre ambas. Este resultado fue imperceptible a simple vista. Por el contrario, a los 5 días de almacenamiento, si se pudo ver un aumento en el desarrollo de hongos, pero principalmente se observó en los bordes donde no había contacto en los materiales. Esta observación coincidió con el recuento informado en la Tabla 2.6. Finalmente, a los 7 días de almacenamiento el pan cubierto con la película comercial presentó el mayor desarrollo de hongos, superando las 10^6 UFC/mL, lo cual claramente limitó la vida útil

de la muestra. Al comparar las rebanadas recubiertas con los materiales desarrollados, si bien se registró un aumento en el recuento de hongos, los valores obtenidos se mantuvieron por debajo de las 10^6 UFC/mL.

En general no se encontraron diferencias entre el efecto de la película control conteniendo 71,5 de jugo de limón y su contraparte nanocompuesta, lo cual indica que la acción antimicrobiana y antifúngica está siendo aportada por el jugo de limón, y principalmente por el contenido de ácido cítrico (3,74 % para estas muestras). Este resultado concuerda con lo discutido en la Sección 4.3.7 donde se observó que tanto los controles conteniendo jugo de limón como las películas nanocompuestas conteniendo AgNP L presentaban actividad antimicrobiana.

Tabla 2.5: Recuentos para las rebanadas de pan almacenadas a 20 °C durante 7 días utilizando como separadores un material sintético y las películas control y nanocompuestas desarrolladas en este capítulo.

Tiempo de almacenamiento (días)	Recuento mesófilos totales (UFC/mL)		
	Control	Cont L	AgNP L
0	0	0	0
3	$1,31 \cdot 10^4$	$1,35 \cdot 10^3$	$1,87 \cdot 10^3$
5	$8,1 \cdot 10^5$	$2,61 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^5$
7	$4,4 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^5$
Recuento hongos y levaduras (UFC/mL)			
0	0	0	0
3	$1,3 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$
5	$5,3 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^4$
7	$> 10^6$	$6,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$

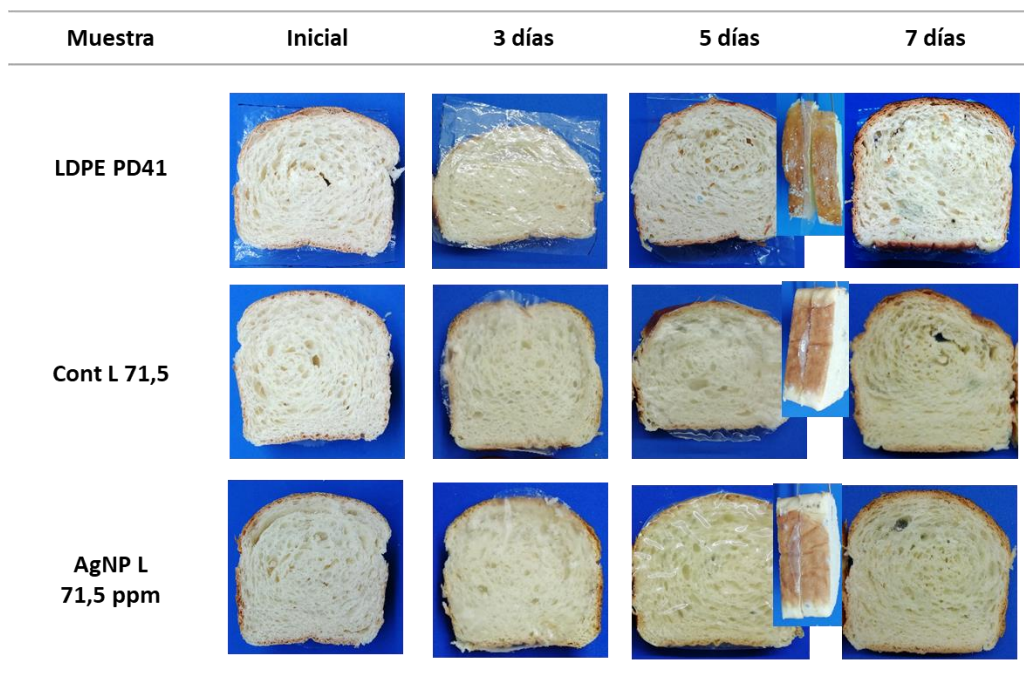


Figura 2.22: Evaluación de la aplicación de las películas desarrolladas como posibles materiales separadores para prolongar la vida útil de rebanadas de pan lacteado.

Cabe destacar que si bien los resultados muestran un alto desarrollo de microorganismos, este estuvo localizado en los bordes y en la cara que no estuvo en contacto con la película control o nanocompuesta.

5. CONCLUSIONES

La caracterización de los componentes presentes en el jugo de limón permitió determinar que éste es un reactivo de bajo costo y muy interesante para la obtención de AgNPs mediante síntesis verde. Los compuestos presentes en el jugo de limón no solo actúan como agentes reductores y estabilizantes, sino que también permiten obtener soluciones de NP de alta estabilidad a bajas temperaturas y tiempos de reacción cortos.

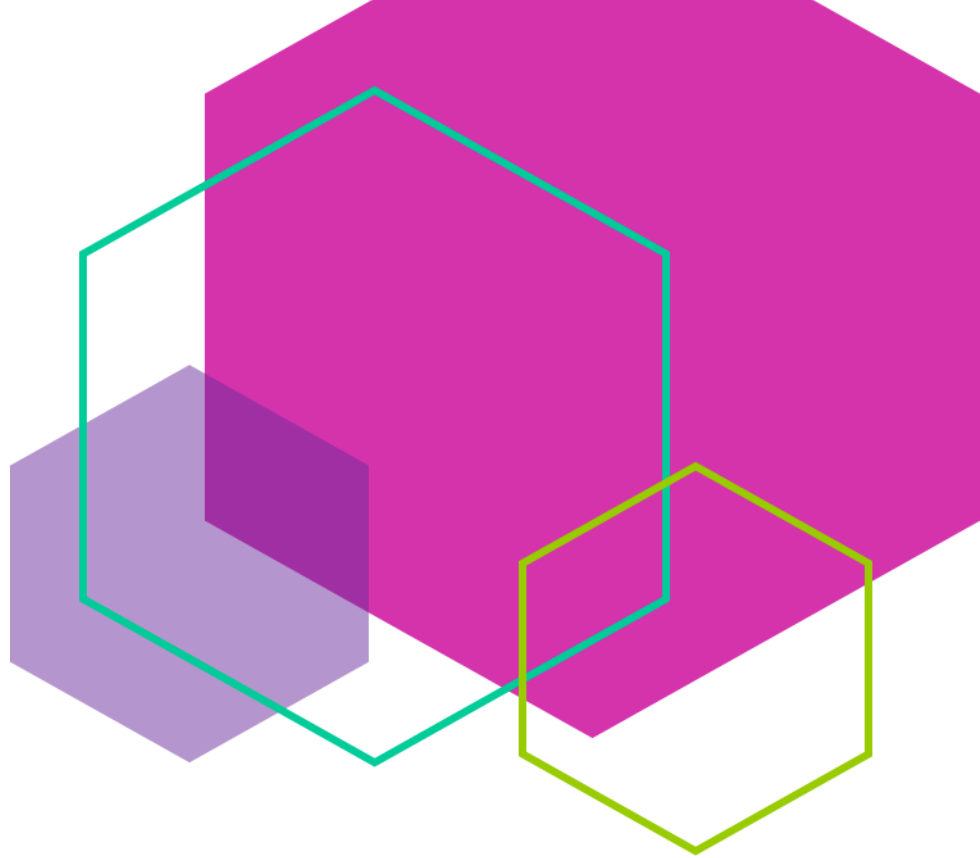
Se demostró que las nanopartículas de plata se pueden sintetizar de manera eficiente utilizando los componentes activos del jugo de limón, siendo las condiciones óptimas 90 ° C durante 30 min. Las nanopartículas sintetizadas presentaron morfología esférica y baja polidispersidad, resultando las suspensiones con AgNP L muy estables, incluso luego de 90 días de almacenamiento al resguardo de la luz.

Las películas nanocompuestas a base de almidón con agregado de AgNP L exhibieron una ligera tonalidad naranja, la que fue dependiente de la concentración de AgNP L incorporada.

Se estudió, además, el impacto del agregado de jugo de limón a las matrices, identificando el efecto que el ácido cítrico provocaba en las mismas, el cual, dependiendo de la concentración agregada actuó como agente hidrolizante, entrecruzante o plastificante.

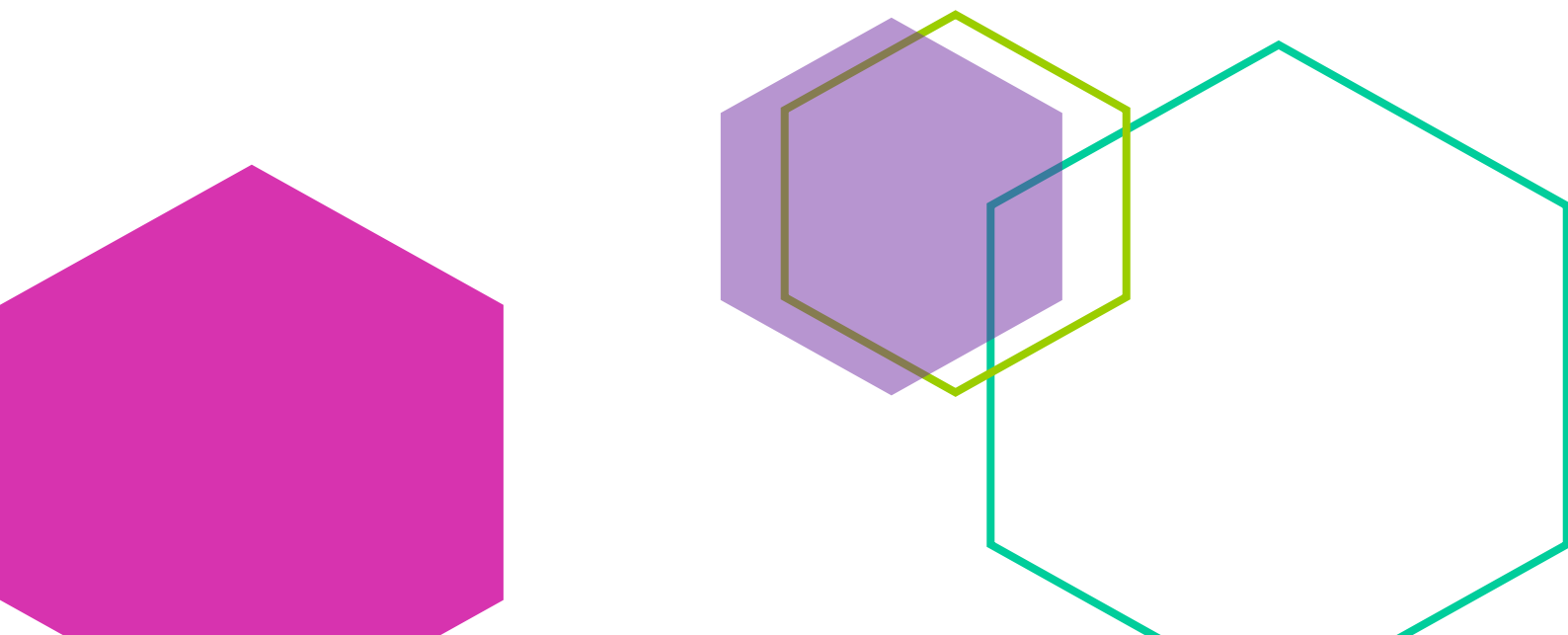
Mediante técnicas espectroscópicas, de microscopía electrónica y térmicas fue posible estudiar la microestructura de los materiales desarrollados, siendo las técnicas de ATR-FTIR y Raman particularmente útiles a fin de estudiar las interacciones entre los componentes de la matriz.

Las películas que contenían 71,5ppm de AgNP L mejoraron tanto las propiedades de barrera de vapor de agua como la resistencia mecánica, mantuvieron su capacidad de sellado térmico y presentaron capacidad antimicrobiana contra bacterias indicativas de buenas prácticas de fabricación, al igual que su respectivo control, lo cual es relevante para aplicaciones de envasado de alimentos. En este trabajo de Tesis se propuso su uso como separador de rebanadas de pan lacteado y evaluando su desempeño en relación a un material sintético ampliamente utilizado para este fin.



CAPÍTULO 3

Síntesis, caracterización e incorporación de nanopartículas de plata asistidas por ablación láser (AgNP F) a películas de almidón de maíz



1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito anteriormente, la generación de nanopartículas puede darse por alguna de las dos “estrategias” conocidas: *bottom-up* o *top-down*. La primera incluye síntesis químicas a partir de precursores inorgánicos, dando lugar a las nanoestructuras a través de procesos de auto-ensamblado en donde la forma y tamaño están controlados por los parámetros de reacción o deposición. Por el contrario, mediante el mecanismo *top down* los nanocompuestos se generan a partir de la ruptura de un material macroscópico por algún agente externo (Cushing, Kolesnichenko, y O’Connor, 2004; Dahl, Maddux, y Hutchison, 2007; Masala y Seshadri, 2004).

Dentro de la estrategia *top-down* el método más tradicional es la litografía, ya sea por irradiación con haz de electrones (EBL, del inglés *electron beam lithography*), o con haz de iones enfocados (FIB, del inglés *focused ion beam*). Sin embargo, desde hace unos años se ha impulsado la investigación de una técnica física basada en la ablación láser de blancos sólidos en medios líquidos (LAL, del inglés *laser ablation in liquid*), como una alternativa a la síntesis de nanopartículas metálicas (Amendola y col., 2015; Mafuné, Kohno, Takeda, Kondow, y Sawabe, 2000; Zamiri y col., 2012). En este proceso, un láser *arranca* o vaporiza material de la superficie de un sólido al incidir sobre él. El material que se desprende forma un chorro de gas, a veces incandescente, llamado *pluma de ablación* por su forma ovalada. Una ventaja que presentan estos métodos es la obtención de suspensiones de NPs libres de residuos químicos; además, suelen ser procedimientos rápidos que no requieren de altas temperaturas y de varios pasos de síntesis.

La técnica de ablación consiste en enfocar un láser pulsado de alta potencia sobre un blanco metálico (*bulk*) que se encuentra sumergido en el solvente elegido para la síntesis. La energía del pulso láser es absorbida por el material, produciendo una pluma de plasma que contiene el material ablacionado (proceso *top-down*). Esta pluma se expande hacia el líquido circundante produciendo una onda de choque, que se propaga en todas las direcciones desde el punto de incidencia del láser. La expansión genera una disminución en la temperatura de la pluma que, junto con la formación de una burbuja de cavitación, actúa como un reactor para la formación de nanopartículas a través de la

condensación de átomos (proceso *bottom-up*) (Amendola y col., 2015; D. Zhang, Gökce, y Barcikowski, 2017). En este sentido, la ablación láser en un medio líquido puede considerarse como una técnica híbrida entre los procesos *top-down* y *bottom-up* (Arce y col., 2017). En la Figura 3.1 se presenta un esquema del proceso.

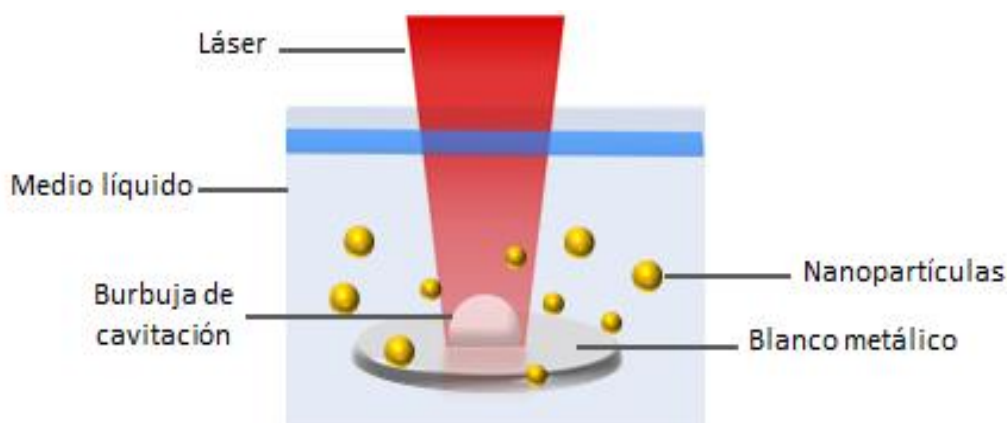


Figura 3.1. Esquema del proceso de obtención de NPs asistida por ablación láser.

Se han estudiado diferentes mecanismos de formación de NPs durante la ablación, los cuales dependen de los tiempos de aplicación de los pulsos del láser. Con tiempos de nanosegundos (ns), se han obtenido nanopartículas de Ag y Au utilizando un láser de Nd:YAG (láser de estado sólido pulsado de neodimio y granate de aluminio e itrio) con pulsos de 10 ns (Fumitaka Mafuné, Kohno, Takeda, y Kondow, 2003; Fumitaka Mafuné y col., 2000; Fumitaka Mafuné, Kohno, Takeda, Kondow, y Sawabe, 2000; Scaramuzza, Zerbetto, y Amendola, 2016). También se han obtenido nanopartículas en suspensiones de Ti, Si y Cu mediante ablación láser con pulsos en el rango de los 10 y 20 ns (Dolgaev, Simakin, Voronov, Shafeev, y Bozon-Verduraz, 2002; Kazakevich, Simakin, Voronov, y Shafeev, 2006). Cuando la síntesis de nanopartículas por ablación se realiza en el régimen de los femtosegundos (fs, 10^{-15} s), ablación láser con pulsos ultracortos, las intensidades extremas involucradas y el corto tiempo de interacción lleva a la expulsión de material desde el *bulk*, el cual finalmente se nuclea y forma NPs con morfología esférica de pocos nanómetros las cuales pueden presentar o no, un recubrimiento (*core-shell*) (Desarkar, Kumbhakar, y Mitra, 2013).

Diferentes polímeros, tanto orgánicos como inorgánicos, se han utilizado como agentes de *capping* en nanopartículas inorgánicas durante o después del proceso de ablación láser para formar compuestos *core-shell*, NP-polímero. Debido a que el polímero que conforma el *capping* suele ser el mismo que compone el medio dispersante, el acoplamiento partícula-polímero se logra directamente.

Varios polímeros naturales como almidón, gelatina y quitosano, o albúmina de suero bovino (BSA), se han utilizado como estabilizantes para obtener nanopartículas con un tamaño controlado, bien dispersas y con mayor estabilidad. Otra ventaja de disolver polímeros o biomoléculas en el medio líquido durante la síntesis láser es que en muchos casos pueden inhibir la oxidación y así obtener partículas libres de óxido. Zamiri, y col. (2012) han utilizado almidón, gelatina y quitosano para estabilizar AgNPs sintetizadas por ablación, con un láser de Nd:YAG y encontraron que, el almidón es más efectivo para el proceso de formación y estabilización de las nanopartículas que los otros biopolímeros ensayados. Mientras que Barry y col. (2014), demostraron que el quitosano podía estabilizar AuNPs cargadas negativamente, evitando la agregación y precipitación, no sólo durante la síntesis por ablación, sino también después de 24 meses de almacenamiento. También se estudió la influencia del almidón soluble como agente estabilizante de AgNPs fabricadas con láser de femtosegundo (Arce y col., 2017).

Por otra parte, se encuentran publicados innumerables trabajos sobre el desarrollo de películas nanocompuestas que incorporan AgNPs obtenidas por reducción química de una solución de AgNO_3 (Abreu y col., 2015; Cheviron y col., 2014; Kanmani y Rhim 2014; Ortega y col., 2017; Rhim y col., 2013; Salman Sarwar y col., 2018; Zhang y Jiang 2019), sin embargo, no hay suficientes publicaciones que hagan referencia a la incorporación de AgNPs obtenidas mediante técnicas de ablación láser a películas biodegradables. Por otro lado, si bien el equipo necesario para la síntesis de las nanopartículas es costoso, los gastos podrían amortiguarse ya que, se puede obtener un gran volumen de NPs estables en tiempos cortos y sin consumir grandes cantidades de energía. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este Capítulo de la Tesis se propuso estudiar la viabilidad de la obtención de películas nanocompuestas a base de almidón de maíz con

incorporación de AgNPs obtenidas por asistencia de un láser de Ti:Za (Titanio:Zafiro) de pulsos ultracortos.

2. LOS OBJETIVOS PROPUESTOS EN ESTE CAPÍTULO FUERON:

- Obtener nanopartículas de plata mediante un método de síntesis física (AgNP F) y caracterizarlas.
- Evaluar el efecto de la incorporación de las AgNP F a suspensiones filmogénicas de almidón de maíz, con el fin de obtener películas nanocompuestas.
- Caracterizar los materiales obtenidos y evaluar su posible aplicación como envase para alimentos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de las nanopartículas de plata por la técnica de ablación láser, (AgNP F), se utilizó almidón de papa soluble (Anedra, CAS [9005-84-9]) como agente de *capping* y una moneda de plata de 99,99 % de pureza. Las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura con una resistencia específica de 18 M Ω .

3.1. Preparación y caracterización de las AgNP F

La síntesis de las AgNPs mediante ablación láser, AgNP F, se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp), ya que cuenta con la infraestructura necesaria para la misma.

El esquema de la Figura 3.2 muestra el arreglo experimental utilizado para la síntesis de suspensiones coloidales de AgNPs utilizando el láser de femtosegundos instalado en el CIOp.

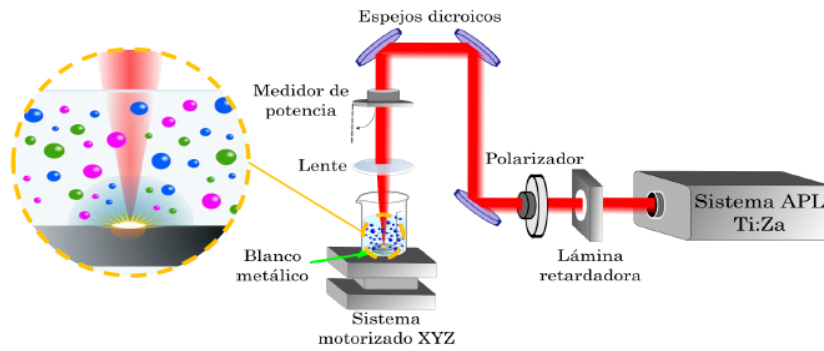


Figura 3.2: Arreglo experimental implementado para la síntesis de las suspensiones coloidales de NPs metálicas mediante ablación láser de femtosegundo. (adaptado de Muñetón Arboleda, 2018).

Las AgNP F se obtuvieron utilizando un sistema amplificador de pulsos de un láser de Ti:Za (Titanio:Zafiro, Spectra Physics), con pulsos de 120 fs de ancho y una frecuencia de repetición de 1 kHz centrada en una longitud de onda de 800 nm. La energía del haz fue controlada con un sistema compuesto por un polarizador y una lámina retardadora de longitud de onda media (Figura 3.3a, derecha). Este haz fue guiado mediante un arreglo de espejos dielectricos hasta una lente de distancia focal de 5 cm con la que se hace foco sobre la superficie del blanco de plata de alta pureza (99,99%) (Figura 3.3a, izquierda). La energía de pulso que se utilizó para este trabajo de Tesis fue de 500 μ J. El recipiente conteniendo el blanco metálico sumergido en una solución de almidón soluble 1% p/v, se desplazó mediante un sistema de maquinado motorizado X-Y-Z con el cual se asegura que el haz del láser impacte cada cierto tiempo en una zona distinta del blanco de plata. Este proceso de síntesis duró 9 minutos, a partir del cual se obtuvo una suspensión de color amarillento, que indica la formación de AgNPs.

En la Figura 3.3b se pueden observar, a modo de ejemplo, fotografías del trazado lineal continuo grabado sobre el blanco metálico, níquel en este caso, después de la síntesis asistida por láser, observándose cómo el haz del láser ablaciona diferentes puntos de la pieza metálica. Mientras que en la imagen 3.3 c, se puede ver, a modo de ejemplo, las AgNP F obtenidas y utilizadas en este Capítulo de Tesis.

La suspensión de AgNP F fue caracterizada por las técnicas de espectroscopía UV-visible, potencial Z, espectroscopía Raman, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de transmisión (TEM), ya mencionadas en los Capítulos 1 y 2, y espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) para determinar la concentración de Ag en la suspensión.

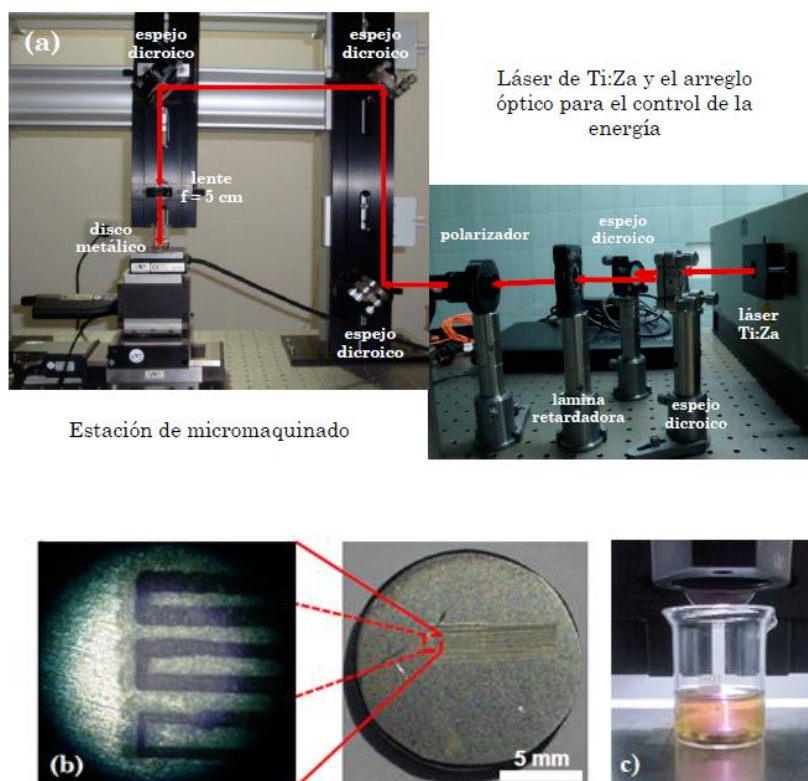


Figura 3.3: Fotografías del montaje experimental en la implementación de la técnica ablación láser para la síntesis de NPs metálicas. a) Derecha: salida del sistema amplificador de Titanio:Zafiro, los espejos dielectricos, la lámina retardadora y el polarizador. Izquierda: arreglo de los 3 espejos dielectricos, la lente de enfoque, el blanco metálico sumergido en un vaso de precipitado conteniendo el solvente y la plataforma con los desplazadores X-Y-Z. b) Trazado lineal continuo grabado sobre un blanco sólido de Ni después de la síntesis. c) Láser atravesando la suspensión e impactando sobre el blanco de Ag para obtener las AgNP F. (Figuras a y b adaptadas de Muñetón Arboleda, 2018)).

3.1.1. Espectroscopía de absorción UV-visible

Los espectros de absorción de la suspensión de AgNP F se registraron inmediatamente después de la síntesis mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-1650 (Shimadzu Co., Kyoto, Japón) con una resolución de 0,5 nm. La suspensión se colocó en una celda de cuarzo y se midió en el rango de 300 -1000 nm.

3.1.2. Potencial Z

Se midió el potencial Z de las nanopartículas de plata obtenidas por ablación láser utilizando un equipo Brookhaven 90Plus/Bi-MAS (Brookhaven Instruments Corporation, Nueva York, EE.UU.), previamente las muestras fueron diluidas con una solución acuosa de KNO_3 10^{-3} M a 25 °C. Como ya se mencionó, esta determinación brinda información sobre la carga superficial de las nanopartículas y a partir de ésta es posible evaluar la estabilidad de las suspensiones preparadas.

3.1.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para conocer la morfología y tamaño de las AgNP F, se tomaron imágenes con el TEM-MSJ Jeol 2100 (Jeol, Tokio, Japón), aplicando un voltaje de aceleración de 200 kV. La suspensión de nanopartículas se diluyó con agua ultrapura y a continuación se sonicó durante 15 min. Finalmente, la muestra con las AgNP F dispersas se dispuso sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y a continuación se realizó una limpieza con plasma para evitar posibles residuos orgánicos. Las imágenes se capturaron utilizando un TV Gatan ES500W y una cámara acoplada al dispositivo (CCD) (TVips-16MP) (Gatan Inc., Pleasanton, California, EE.UU.).

3.1.4. Espectroscopía Raman

Los espectros Raman se adquirieron con un microscopio de barrido confocal Horiba-Jobin Yvon XPlora Plus (Horiba Ltd., Kyoto, Japón). Se colocaron gotas de la suspensión coloidal de AgNP F en un portaobjetos de vidrio y se secaron a temperatura ambiente durante 24 h. Los espectros Raman se registraron en la zona comprendida entre 100 y 2000 cm^{-1} con un objetivo de 100X.

3.1.5. Espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

Debido a que es imprescindible conocer la concentración de las AgNP F en la suspensión obtenida anteriormente para poder tener un contenido de Ag equivalente a la de la formulación con NPs *in situ*, se utilizó la técnica de ICP-OES para tal fin.

La espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) es una de las técnicas más usadas para determinar trazas de elementos en una gran variedad de matrices, las cuales comúnmente deben digerirse previamente. La introducción continua de la muestra líquida, y un sistema de nebulización, forma un aerosol que es transportado por argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio-frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generando los espectros de emisión atómica de líneas características.

La muestra para el análisis fue preparada según lo propuesto por Shen y col. (2015) con algunas modificaciones. Para determinar el contenido de plata de las nanopartículas, se digirieron 0,5 mL de la suspensión de AgNP F con 0,5 mL de HNO₃ concentrado durante 30 min. Luego, se añadió agua desionizada hasta un volumen final de 10 mL. La solución resultante se analizó mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente con un equipo Shimadzu ICPE-9800 (Shimadzu Co., Kyoto, Japón) acoplado con un Automuestreador automático ASX-520 (CETAC Technologies), mientras que las digestiones fueron realizadas con un digestor de microondas de 12 posiciones QLABPro Mca Questron (Horiba, Japón). Este ensayo se realizó en el Laboratorio UPL dependiente de la UNLP y CICPBA.

3.2. Desarrollo de películas de almidón de maíz nanocompuestas con AgNP F

Al igual que en los capítulos anteriores, las películas se obtuvieron por el método de *casting* (moldeo). En esta ocasión sólo se desarrollaron películas nanocompuestas con una concentración de AgNP F de 143 ppm, la cual se definió en función a los resultados obtenidos previamente en relación a las propiedades mecánicas y de barrera, así como también su capacidad antimicrobiana (Capítulo 1). Como se encuentra representado en el esquema (Figura 3.4), a 74 mL de una suspensión de almidón de maíz al 3 % p/v se le

incorporaron 26 mL de la solución de AgNP F, previamente sonicada durante 5 min, y se gelatinizó a 90 °C durante 20 min con agitación continua en un baño termostático. Seguidamente la suspensión nanocompuesta se enfrió hasta 50 °C, se le incorporó glicerol 30 % p/p (30 g de glicerol/ 100 g de almidón) como plastificante y finalmente, se moldeó y se secó en una estufa de convección forzada por aire a 50 °C durante 5 h para obtener las películas nanocompuestas, de forma análoga a la descrita en el Capítulo 1.

Las películas control se obtuvieron reemplazando la suspensión de AgNP F por el volumen equivalente de agua ultrapura, realizando luego el mismo proceso de preparación.

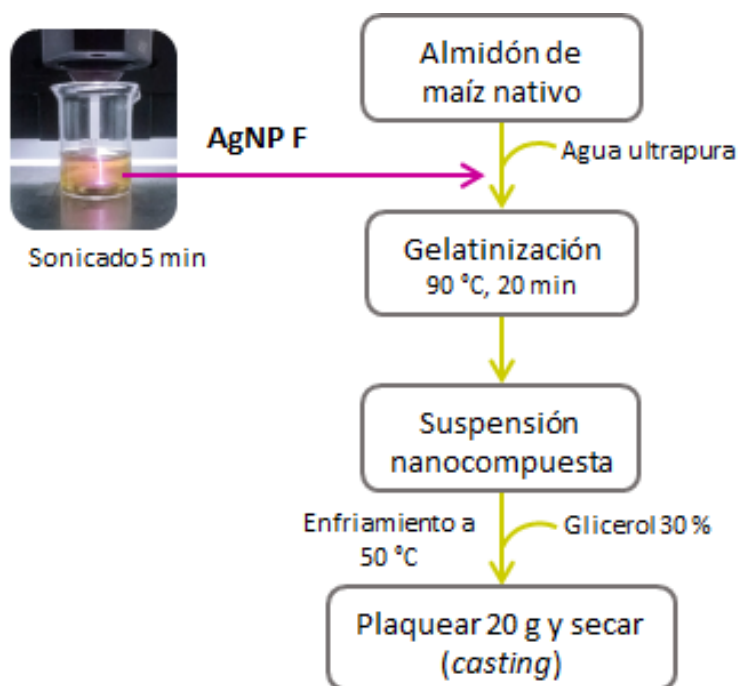


Figura 3.4: Esquema de la obtención de las películas de almidón nanocompuestas con incorporación de las AgNP F.

3.3. Técnicas de caracterización aplicadas a las películas nanocompuestas

Para la caracterización, de las películas desarrolladas en este capítulo de Tesis se siguieron los protocolos mencionados en el Capítulo 1.

Por un lado, se determinaron características relacionadas con la estructura de la matriz mediante técnicas de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido (SEM), y a continuación se evaluó el color, espesor, la solubilidad en agua, el contenido de humedad, la capacidad de barrera al UV, transparencia, propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua de las películas obtenidas.

3.4. Estudio de la citotoxicidad de las películas conteniendo AgNP F

En este caso, se determinó en primer lugar la citotoxicidad de las películas nanocompuestas y control evaluando la viabilidad celular, mediante determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial. En función de los resultados se evaluó limitar los ensayos de aplicación en el diseño de envases para alimentos, migración y actividad antimicrobiana (que serán descritos en el Capítulo 4).

Se estudió la viabilidad celular sobre las líneas celulares que se mencionan a continuación:

Caco-2/TC7: esta línea de células epiteliales del intestino humano es un clon de la línea Caco-2. Luego de 7 días de incubación creciendo *in vitro* bajo condiciones estándar, exhiben espontáneamente signos estructurales y funcionales de diferenciación y polarización (Chantret y col., 1994).

Las células se cultivaron en medio DMEM (medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco) con 25 mM de glucosa, 15 % de suero fetal bovino (SFB), (Invitrogen, Argentina) inactivado (30 min, 58 °C), 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco, Life Technologies, Rockville MD, EE.UU.), 12 UI/mL de penicilina y 12 µg/mL de estreptomina (Life Technologies, Cergy, Francia). Para los ensayos, las células se inocularon en placas de 24 o 48 fosas a razón de $2,5 \times 10^5$ células/mL y se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 7 días.

Vero: Esta línea celular consiste en fibroblastos provenientes de riñón de mono. Son células de rápido crecimiento, obteniéndose cultivos confluentes al cabo de 48 h. Esta línea celular es ampliamente utilizada como modelo para ensayos de citotoxicidad dada su sensibilidad a diferentes tratamientos (Popoff, 1987).

Para el cultivo de estas células se usó el mismo medio descrito para las células Caco-2/TC7, pero adicionado con 10% de SFB y se incubaron en idénticas condiciones durante 48 h. Se utilizaron células inoculadas a razón de $2,5 \times 10^5$ células/mL en placas de 24 o 48 fosas.

Todas las líneas celulares se encuentran conservadas en nitrógeno líquido en el correspondiente medio de cultivo adicionado con 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Para su uso se descongelaron en baño de 37°C , se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y el pellet de células se resuspenden en el medio correspondiente para cultivar en botellas de cultivo celular. Las líneas Caco-2/TC7 y Vero se usan como máximo durante 10 pasajes, luego de lo cual se parte de un nuevo stock. Este ensayo fue realizado en colaboración con la Dra. Minnaard del CIDCA.

3.4.1. Evaluación de la viabilidad celular mediante la determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial

La viabilidad celular se define como la proporción de células vivas respecto al total de células de la población estudiada. La determinación de la supervivencia o proliferación de las células es de suma importancia para la evaluación biológica de nanomateriales. Uno de los métodos utilizados para dicho fin es el ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2,l) 2,5-difeniltetrazolio). Este reactivo es una sal de tetrazolio soluble en agua y de color amarillo, que, en células viables se reduce por efecto de la actividad deshidrogenasa mitocondrial a formazán, de color violáceo e insoluble (Figura 3.5). La actividad mitocondrial de las células tratadas, se correlaciona con la intensidad del color, la cual es determinada espectrofotométricamente luego de disolver el formazán en dimetilsulfóxido (DMSO) y es directamente proporcional al número de células viables (Grillo y col., 2010).

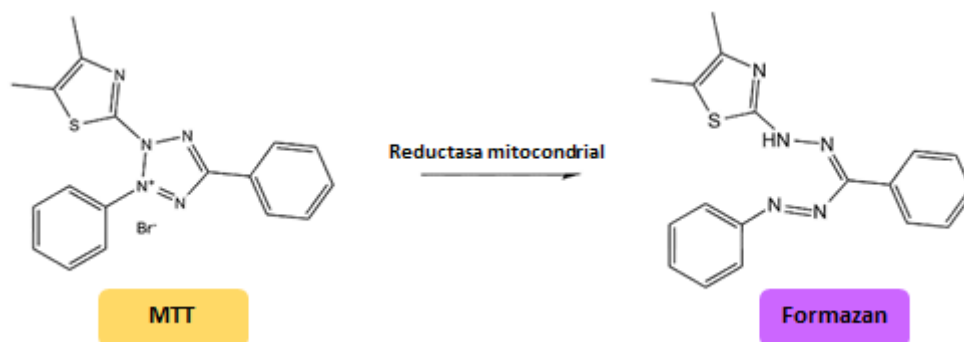


Figura 3.5: Reacción de reducción del reactivo MTT a formazán utilizado para estudiar la viabilidad celular.

Las películas AgNP F se cortaron en cuadrados de 5x5 mm² y se esterilizaron con luz UV durante 5 min de cada lado, mientras que, las células crecidas en placas de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS (buffer fosfato salino), se agregó a cada fosa 200 μL de DMEM adhesión (medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco sin agregado de suero ni antibióticos) y a continuación las películas esterilizadas. Las placas se incubaron durante 1 y 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Cumplido el tiempo de contacto se descartaron las películas, se realizaron 3 lavados con PBS, se agregaron 250 μL del reactivo bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2,l) 2,5-difeniltetrazolio (MTT) (0,5 mg/mL) y se incubaron 2 h a 37 °C para que ocurra la reducción del reactivo por parte de las células que se encuentren viables. A continuación, se retiró cuidadosamente el MTT y se añadió DMSO. Los valores de densidad óptica (DO) se midieron utilizando un lector de placas Synergy HT fluorescence microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.) a 550 nm. El porcentaje de viabilidad celular se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \left(\frac{Am}{Ac} \right) \times 100 \quad [3.1]$$

donde, *Am*= absorbancia de la muestra y *Ac*= absorbancia del control.

El ensayo se llevó a cabo con células Caco-2/TC7 y Vero, las cuales tuvieron tiempos de incubación diferentes antes de la incorporación de las películas, siendo 7 días para las Caco-2/TC7 y 48 h para las Vero respectivamente.

3.5. Análisis estadístico

Para el análisis multifactorial de la varianza, así como las regresiones lineales y no lineales, se emplearon los softwares Systat (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, EE. UU.) Versión 13.0 e InfoStat versión 2017 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). La prueba de discriminación media de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD) permitió determinar las diferencias en las propiedades de las películas obtenidas; a tal fin se usó un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

Asimismo, se llevó a cabo un Análisis por Componentes Principales (ACP) con el fin de analizar la interdependencia entre las características de las nanopartículas obtenidas por diferentes técnicas y las propiedades relevantes de los materiales desarrollados a partir de éstas. Para esto se empleó el Software estadístico InfoStat antes mencionado considerando dos componentes. Del análisis realizado se informó el gráfico Biplot y el valor del coeficiente de correlación cofenética obtenidos, este último es indicativo de la calidad del agrupamiento de las variables en función de los componentes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis y caracterización de las AgNP F

Como se mencionó anteriormente la ablación láser en medio líquido (LAL) es una técnica prometedora para la obtención de nanopartículas metálicas. Las AgNPs cuentan con propiedades ópticas que dependen de su tamaño, forma, estado de aglomeración y superficie, y esto se ve reflejado en la localización de su plasmón de resonancia superficial (SPR) (Hu y col., 2020). Este fenómeno se debe a las oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos, y particularmente en las NPs, es una consecuencia directa de su tamaño, y de que la mayoría de sus átomos están en la superficie. Es así que los electrones de la superficie son capaces de interactuar con la radiación electromagnética de forma más compleja, dependiendo de las características previamente mencionadas (Cruz y col., 2012). El espectro de las AgNP generadas a partir de ablación láser con una energía de pulso de 500 μJ en la solución de almidón soluble al 1 %, se muestran en la Figura 3.6; en el recuadro adjunto se presenta una fotografía de la suspensión de las AgNP F obtenidas. Inicialmente la

solución de almidón al 1 % era incolora y transparente, cambiando a amarillo a medida que avanzaba la acción del láser sobre el blanco de Ag. El desarrollo de color amarillo indica la formación de AgNPs (AgNP F) en la suspensión.

Puede verse que el espectro presenta la resonancia de plasmón característico de las nanopartículas de Ag a aproximadamente 400 nm. El hecho de que solo aparezca un plasmón en el rango de longitud de onda UV-vis sugiere que las nanopartículas obtenidas son de forma esférica.

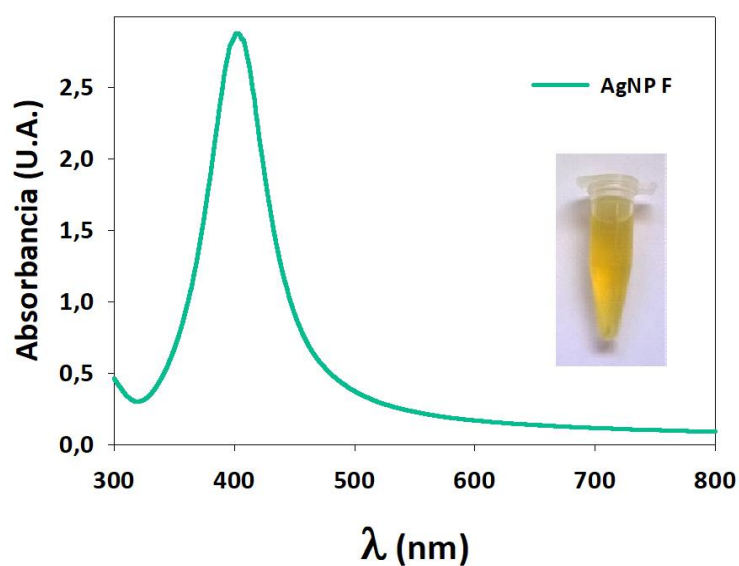


Figura 3.6: Espectro UV- vis de las AgNP F en una suspensión de almidón al 1 %, obtenidas por ablación láser fs con energía de pulso de 500 μ J.

En la Figura 3.7 se comparan los espectros UV-vis normalizados de las suspensiones de AgNPs obtenidas por las diferentes técnicas descritas en este trabajo de Tesis. Se puede observar que cuando la suspensión de AgNPs se obtiene por ablación láser (AgNP F) el pico del plasmón es de 402 nm, mientras que para las suspensiones obtenidas por síntesis química se observa un corrimiento hacia mayores longitudes de onda, siendo de 431 nm y 470 nm para las AgNP *in situ* y AgNP L, respectivamente. Además, es posible observar una marcada diferencia en el ancho de los mismos; este resultado permite inferir que probablemente las AgNP F presenten mayor monodispersidad que las nanopartículas obtenidas por los métodos de síntesis química realizados. Según lo

publicado por Santillán y col. (2011) estos resultados sugieren que las AgNP F tienen tamaños más pequeños que las AgNP *in situ* y AgNP L (Santillán y col., 2011). Por otro lado, para el caso de las AgNPs obtenidas por síntesis química verde la amplitud del plasmón también puede estar relacionada con la naturaleza del agente reductor, el método de preparación, la acidez de la mezcla de reacción y con la ausencia/presencia de agentes estabilizantes (Khan, Singh, Ijaz, y col., 2013).

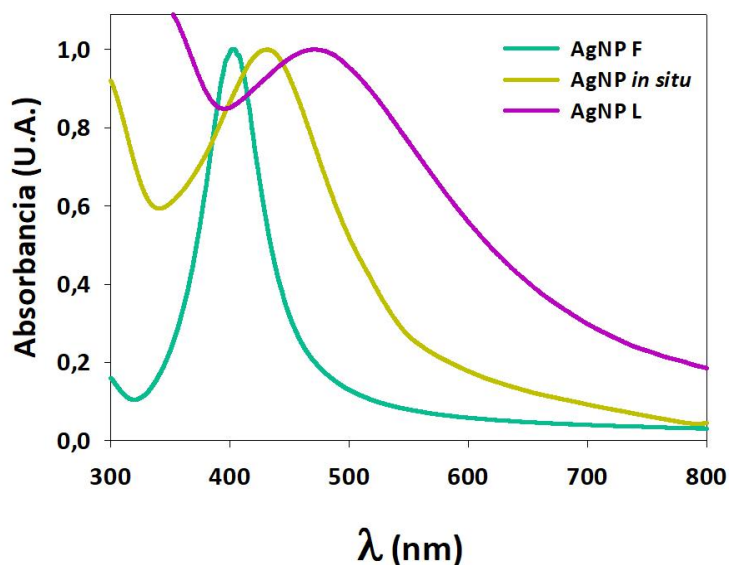


Figura 3.7: Comparación de espectros UV-vis normalizados de las suspensiones de AgNPs obtenidas por diferentes técnicas de síntesis: físicas (AgNP F) o químicas (AgNP *in situ* y AgNPL).

Las imágenes obtenidas por TEM para las AgNP F se pueden ver en la Figura 3.8. Analizando la vista panorámica (Figura 3.8a), se observa que predominan nanopartículas con morfología esférica y que se encuentran bien distribuidas sin aglomerarse, coincidiendo con lo que se había inferido anteriormente, al analizar los espectros UV-vis. También se muestran AgNP F aisladas (Figura 3.8b y c). Al igual que en los Capítulos 1 y 2 se realizó un histograma de tamaño, tomado de varias imágenes similares, y utilizando el software ImageJ, donde se puede ver que las nanopartículas presentan un radio medio de 3 nm (Figura 3.8d), por lo tanto se puede establecer que cuentan con un diámetro promedio de 6 nm. El crecimiento de las AgNP F en la solución de almidón podría estar limitado debido a que las mismas se estarían generando dentro de la hélice

de amilopectina durante el proceso de ablación con láser. De esta manera se obtienen nanopartículas de tamaño comparable al de la hélice de la amilopectina (Pérez y Bertoft, 2010; Tester, Karkalas, y Qi, 2004), si bien esta hipótesis debería confirmarse a través de estudios conformacionales.

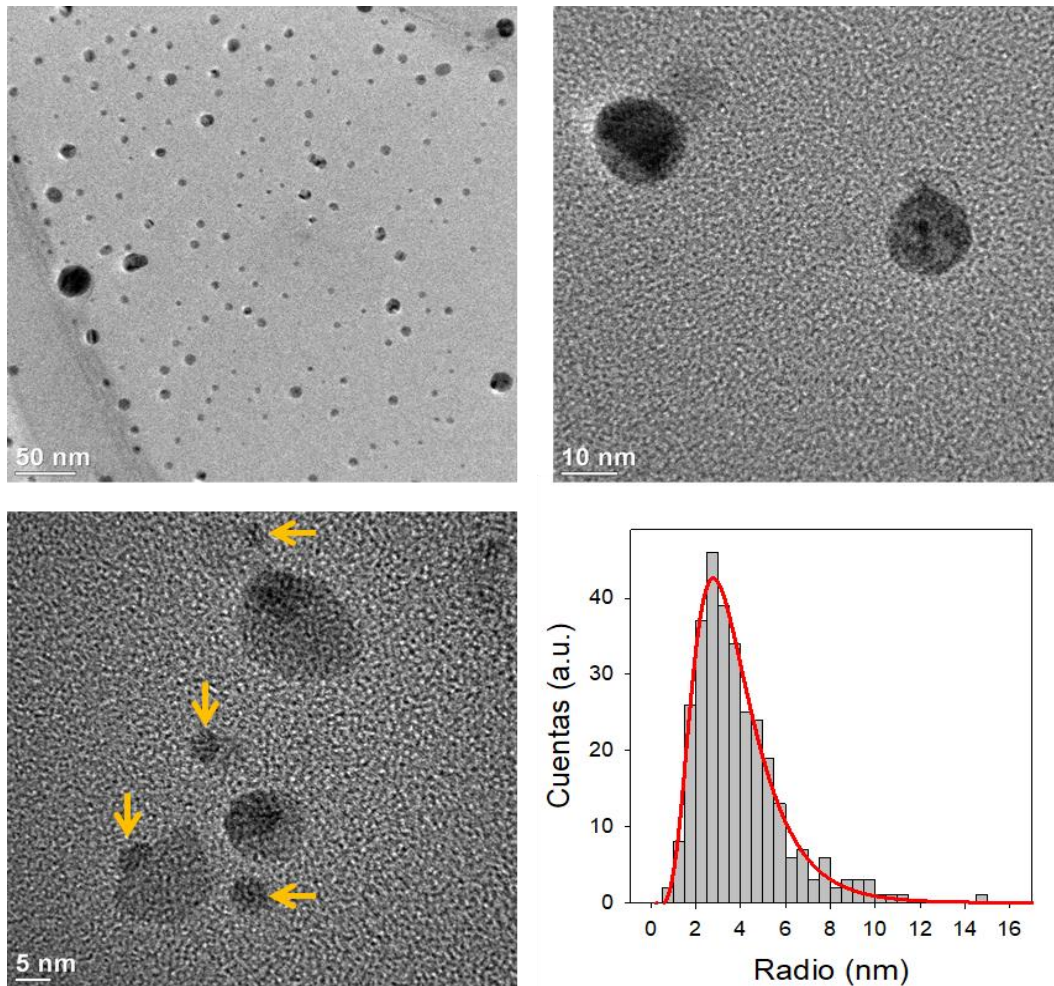


Figura 3.8: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la suspensión de AgNP F (a, b, c). Histograma de distribución de tamaño (d).

Tanto la toxicidad como la exposición a las nanopartículas son factores cruciales en la evaluación de los riesgos relacionados con su aplicación en el envasado de alimentos, y se encuentran íntimamente asociados al tamaño, forma y el recubrimiento de las NPs. En relación al tamaño, algunos autores establecen que las partículas más pequeñas podrían atravesar más fácilmente la membrana citoplasmática, y luego distribuirse sin problema en los órganos pudiendo así, dañar las células por diferentes mecanismos, por

ejemplo, generar *especies reactivas de oxígeno* (ROS) dentro de las células (Liao, Li, y Tjong, 2019; Palem y col., 2018; Yu, Wang, Kong, Lin, y Mustapha, 2019).

Se realizaron estudios de espectroscopía micro-Raman para las suspensiones de AgNPs preparadas por ablación láser, para evaluar la existencia de óxido de plata en la superficie, ya que es común que se forme en este tipo de síntesis (Muñetón Arboleda y col., 2018, Arce y col., 2017). En la Figura 3.9 se muestran los espectros realizados sobre una gota de suspensión de AgNP F, la cual se dejó secar previamente. En la imagen pueden observarse varios picos correspondientes a la vibración Ag_2O y C-H del almidón. Algunos trabajos han reportado que bandas vibracionales Ag-O y Ag-N se dan en el rango de 230 y 248 cm^{-1} , respectivamente (Martina y col. 2005, Upender y col. 2011, Shadak Alee y col. 2013), mientras que a 430, 487, 565 y 950 cm^{-1} la plata puede presentar modos de flexión Ag-O (Martina y col., 2012). Los corrimientos Raman a 240, 490 y 565 cm^{-1} se pueden atribuir a las bandas propuestas por estos autores para el Ag_2O .

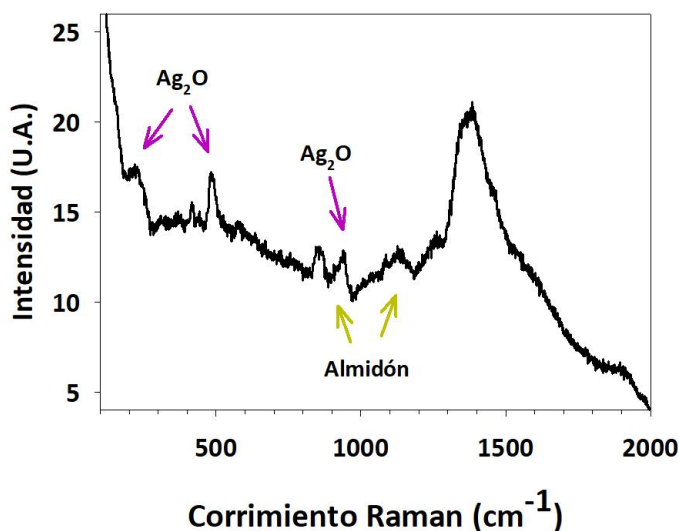


Figura 3.9: Espectro micro-Raman de la suspensión de AgNP F.

Para evaluar la estabilidad de la suspensión conteniendo nanopartículas obtenidas por ablación láser, se realizaron mediciones de potencial Z. El valor alcanzado para las AgNP F fue de -21,8 mV. Al comparar el ζ determinado para las diferentes suspensiones

nanocompuestas se observó que este último fue bastante menor que para las sintetizadas por métodos reductivos (-12,7 y -10,8 mV, para AgNP *in situ* y AgNP L, respectivamente) indicando, una mayor estabilidad de las partículas sintetizadas por la técnica asistida con láser respecto de las obtenidas por reducción química de la sal de plata (Zamiri y col., 2013). Una posible explicación a este resultado puede estar asociado con la presencia de una capa más extensa de Ag₂O en las AgNP F, la cual ya fue descrita en el Capítulo 1, Sección 4.5.1 y al analizar los resultados de la espectroscopía Raman.

Cabe destacar la importancia de conocer la cantidad de plata presente en las suspensiones de nanopartículas preparadas, dado que así se podrá estimar el contenido de la misma en los films nanocompuestos desarrollados para este trabajo de Tesis.

En el caso de las suspensiones preparadas por síntesis química es posible calcular el contenido de Ag a partir de la cantidad del precursor de plata utilizado ya que el agente reductor se agrega en exceso. En cambio, cuando se utiliza como método de obtención de NPs la ablación láser, es necesario cuantificar la plata una vez obtenida la suspensión de nanopartículas. En esta ocasión se utilizó la técnica de ICP-OES para poder hacer la determinación de plata presente en las suspensiones de AgNP F. El análisis realizado arrojó un valor de 190 µM de Ag en las suspensiones nanocompuestas preparadas por ablación láser.

4.2. Caracterización microestructural de las películas con incorporación de AgNP F

4.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Los espectros ATR-FTIR de las películas almidón control y conteniendo nanopartículas de plata obtenidas por ablación láser se presentan en la Figura 3.10. Al igual que lo descrito en el Capítulo 1, Sección 4.3.7.1 el espectro de la almidón control muestra una banda de absorción ancha a 3300 cm⁻¹ correspondiente a interacciones por puente de hidrógeno intra- e inter- moleculares entre los grupos OH (estiramiento O-H) y a continuación, otra banda entre 2850 y 2930 cm⁻¹, correspondiente a los modos vibracionales C-H entre los grupos metilo y metilenos de los carbohidratos (Figura 3.10b). En la región 1700 - 1200 cm⁻¹, más precisamente entre 1640 - 1650 cm⁻¹ se

observan vibraciones de estiramiento O–H del agua adsorbida en la región no cristalina de las películas de almidón (Nordin y col., 2020). En esta zona también se pueden encontrar modos vibracionales correspondientes al estiramiento del C=O (Zamiri y col., 2012) (Figura 3.10c). Por último, entre 1200 y 900 cm^{-1} se localizan los picos de absorción correspondientes al estiramiento simétrico de los grupos C–O–C y flexión de C–O–H en el almidón (Raghavendra 2016). El espectro FTIR de la muestra nanocompuesta exhibe un patrón similar al de la película control, sin embargo se detectan algunos cambios en la región 1200 - 900 cm^{-1} para las señales asociadas con la flexión C–O–H. En particular se observa un cambio notorio en la banda centrada en 995 cm^{-1} , presentando mayor intensidad en la película nanocompuesta respecto de la control, la misma es indicativa de la interacción de los grupos OH con las nanopartículas presentes en la matriz poniendo en evidencia la interacción de estos grupos con las AgNP F (Figura 3.10c).

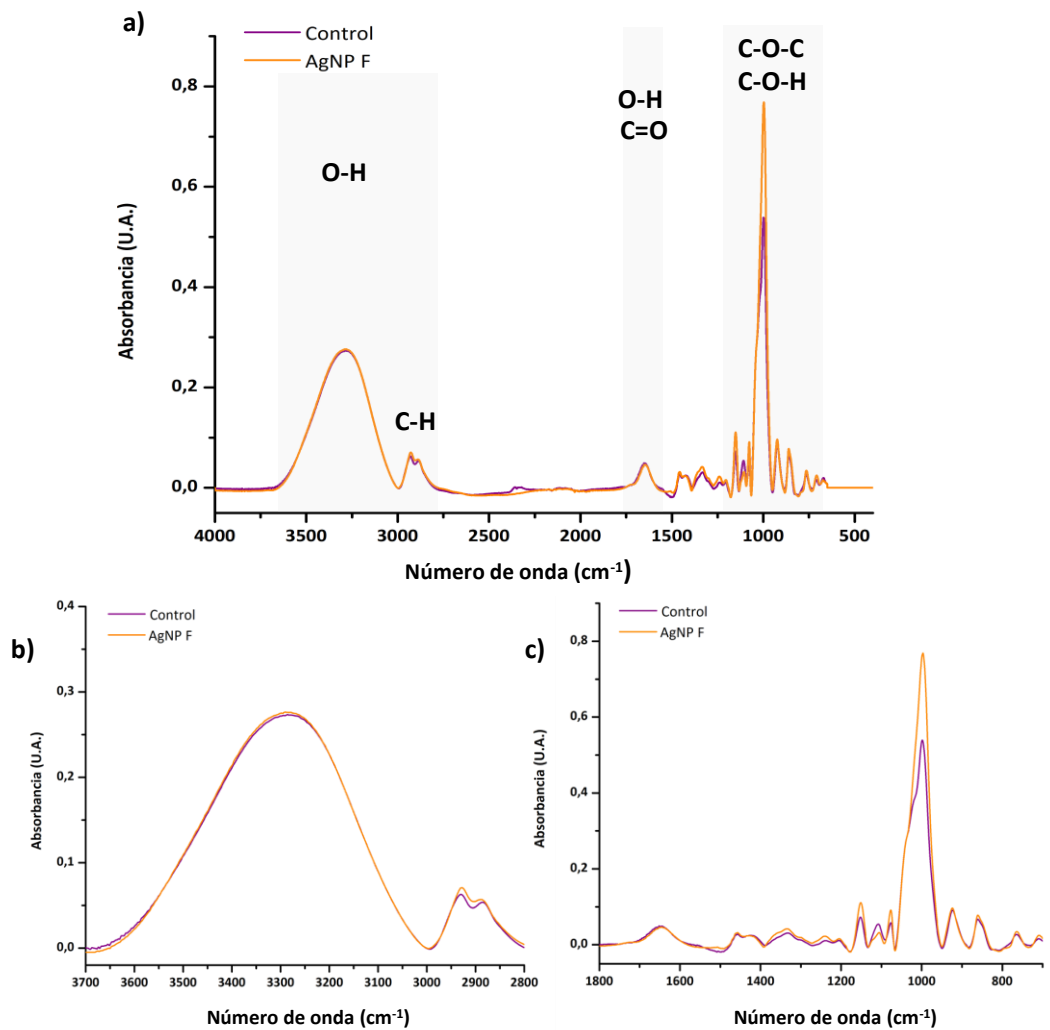


Figura 3.10: Espectros ATR-FTIR de la película con AgNP F y control (a) y, en b) y c), las regiones comprendidas entre 3700 - 2800 cm^{-1} y 1800 - 900 cm^{-1} , respectivamente.

Al comparar los espectros descritos anteriormente con el obtenido para las películas conteniendo AgNP *in situ* (Figura 3.11), se observa que tanto en la zona entre 2930 - 2850 cm^{-1} como entre 1200 - 1050 cm^{-1} , se detectan sutiles diferencias entre en los espectros obtenidos para las películas conteniendo AgNP *in situ* y AgNP F respecto del control, indicando una interacción entre las nanopartículas presentes y la matriz de almidón.

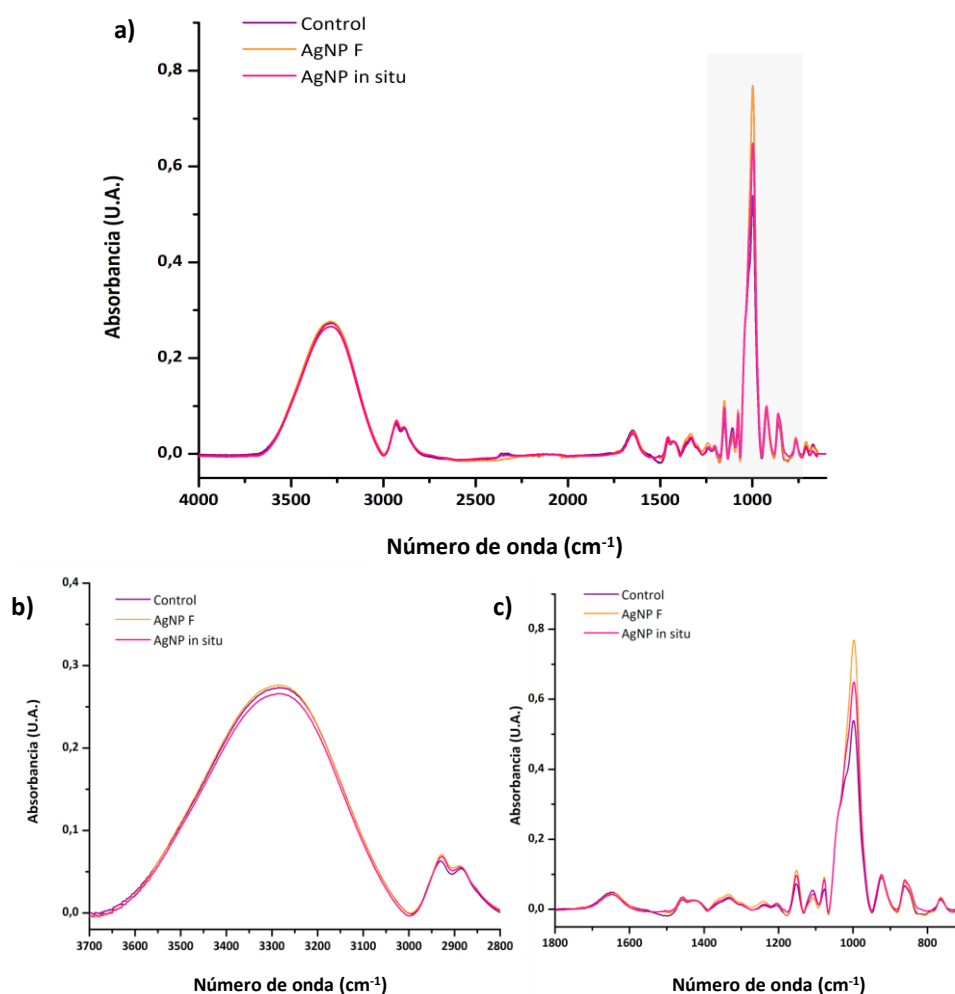


Figura 3.11: Comparación de los espectros ATR-FTIR para la muestra control, y para las películas nanocompuestas con AgNP F y AgNP sintetizadas in situ (a). En b) se muestra la región entre 3700 – 2800 cm^{-1} y en c) la de 1800 – 900 cm^{-1} .

Sin embargo, la principal diferencia se encuentra en la región entre 1200 - 900 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del enlace C–O en el almidón. La intensidad del pico a 995 cm^{-1} es mucho mayor para las muestras con AgNP F, esto podría explicarse considerando el tamaño de las nanopartículas generadas por ambos métodos y la mayor estabilización de las AgNP F que indican mayor interacción de las nanopartículas con las cadenas de almidón.

Además, como ya se ha mencionado, el análisis de las señales 1045, 1022 y 995 cm^{-1} , y las relaciones 1045/1022 y 1022/995 contribuyen a detectar los cambios estructurales en las regiones cristalina y amorfa del almidón. En la Tabla 3.1 se comparan los valores

de las relaciones mencionadas para las películas control, con nanopartículas de plata *in situ* y con inclusión de AgNP F. A partir de los mismos puede observarse que la relación de absorbancias 1045/1022 para las películas con inclusión de AgNP F es menor que la calculada para las películas control y con nanopartículas de plata *in situ*, indicando una menor cristalinidad de las películas con AgNP F, lo que estaría en concordancia con lo expuesto previamente. Asimismo, los cambios observados al comparar la relación 1022/995 para las tres películas (control, *in situ* y AgNP F) muestran el mismo patrón de comportamiento, indicando que estas últimas presentan una disminución de la cristalinidad.

Tabla 3.1: Relación entre las intensidades de las absorbancias a 1045, 1022 y 995 cm^{-1} para las películas control y nanocompuestas con AgNP *in situ* y con inclusión de AgNP F.

Muestra	Relación de absorbancia de los picos 1045/1022	Relación de absorbancia de los picos 1022/995
Control	0,60445	0,70218
AgNP <i>in situ</i>	0,53082	0,65623
AgNP F	0,51257	0,56836

4.2.2. Difracción de rayos X

Las propiedades cristalinas de las películas de almidón de maíz con incorporación de AgNP F se estudiaron mediante el análisis de difracción de rayos X, al igual que en los capítulos anteriores. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.12 en donde se comparan los difractogramas de la película almidón control y con AgNPs *in situ*, con el obtenido para las muestras con AgNP F. Los patrones DRX muestran que si bien la mayoría de los picos en la película con nanopartículas de plata obtenidas por ablación láser se encuentran presentes en la película de almidón control, hay una disminución en la intensidad a $2\theta = 19,5^\circ$ la cual afecta el grado de cristalinidad, ($14,2 \pm 1,3 \%$ y $11,6 \pm 0,8 \%$, respectivamente). Un resultado similar se observa al comparar ambas películas nanocompuestas. Esto coincide con los valores obtenidos en la Sección 4.2.1 para las relaciones de absorbancias de los picos 1045/1022 (que se asocian a la contribución de las zonas cristalinas) siendo de 0,604 y 0,512 para las películas control y

con AgNP F respectivamente. Esta relación para la película con AgNPs *in situ* arroja un valor de 0,531, siendo mayor que el obtenido para AgNP F.

En relación a los picos característicos para la Ag mencionados en el Capítulo 1, no fue posible identificarlos en estas muestras, si bien pareciera que hubiera una señal característica a $2\theta = 46,4^\circ$, enmascarada por el background de la zona amorfa del material.

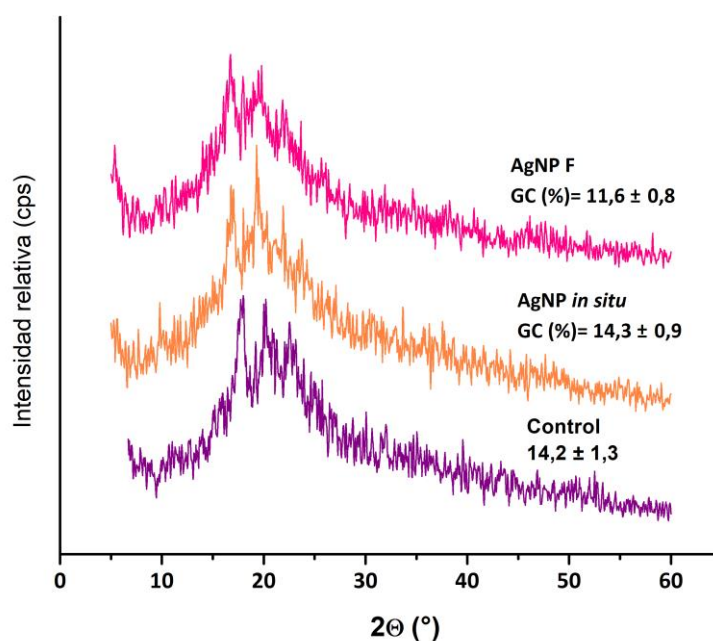


Figura 3.12: Diffractogramas obtenidos para las muestras control y para las películas nanocompuestas con incorporación de AgNP F y su comparación con las que contenían AgNPs *in situ*.

4.2.3. Microscopía electrónica de barrido

Utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido se observó la topografía superficial y un corte transversal de las películas obtenidas en este Capítulo. En la Figura 3.13a se puede ver que la superficie de la muestra es homogénea, sin presencia de grietas, poros o imperfecciones por la incorporación de AgNP F, por lo que podrían esperarse buenas propiedades de barrera y mecánicas para este material. También se

observa que existe una buena compatibilidad entre la matriz polimérica y el plastificante ya que no se detecta migración de glicerol en la superficie.

Al observar el corte transversal (Figura 3.13b) se puede ver una estructura compacta y homogénea en donde las nanopartículas se incorporaron eficientemente a la matriz polimérica. No fue posible individualizar las AgNP F.

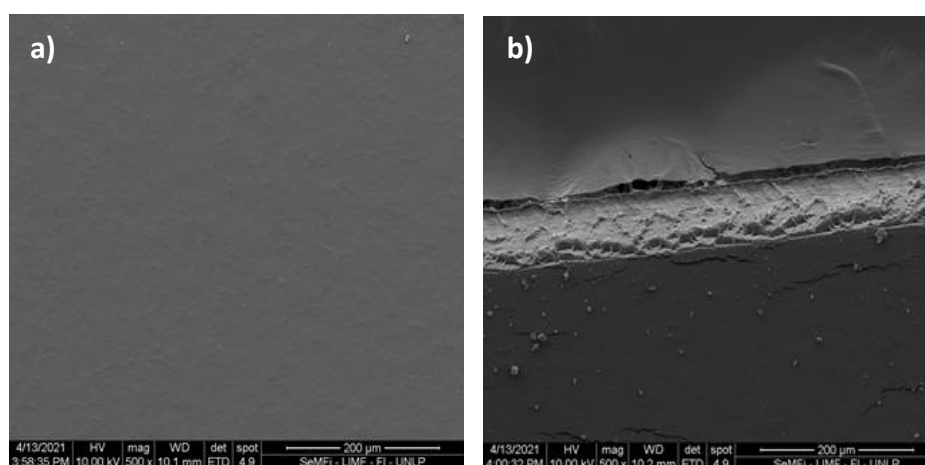


Figura 3.13: a) Micrografías de la superficie de una película de almidón de maíz con agregado de nanopartículas de Ag obtenidas por ablación láser. b) Morfología del corte transversal de la película nanocompuesta conteniendo AgNP F. La magnificación utilizada se indica en la micrografía.

4.3. Caracterización de las películas nanocompuestas

Al igual que en el capítulo anterior, la suspensión filmogénica no se vio afectada por la incorporación de las nanopartículas de plata sintetizadas por ablación láser. Las películas obtenidas por casting, fueron homogéneas y con un espesor promedio de $113 \pm 4,1 \mu\text{m}$ (Tabla 3.2).

4.3.1. Propiedades ópticas

Se puede observar en la Figura 3.14 que el agregado de AgNP F a las películas del almidón les confirió un color amarillo intenso, el cual puede verse reflejado en el incremento del parámetro de cromaticidad b (Tabla 3.2). Comparando con las películas nanocompuestas desarrolladas con AgNPs *in situ*, este parámetro se incrementó

significativamente ($p < 0,05$). Esta diferencias pueden deberse a que, la solución de AgNP F presentó una coloración amarillo intenso (Figura 3.6) y no pudo obtenerse una solución lo suficientemente concentrada como para tener que incorporar un volumen menor a la suspensión filmogénica, y obtener así la concentración final de 143 ppm de Ag.

La luminosidad (L^*) del material también fue influenciada disminuyendo significativamente ($p < 0,05$) por la incorporación de AgNP F en comparación a los materiales nanocompuestos obtenidos con nanopartículas sintetizadas químicamente.



Figura 3.14: Fotografía de una película de almidón de maíz con incorporación de AgNP F con escala CIELab como referencia. Con fines comparativos se incluye la fotografía de su contraparte AgNP *in situ*.

Tabla 3.2: Espesor y parámetros de color determinados para las películas de almidón de maíz nanocompuestas.

Muestra	Espesor (μm)	L*	a*	b*	ΔE
AgNP <i>in situ</i>	102,0 \pm 6,7 ^a	96,57 \pm 0,05 ^b	-0,13 \pm 0,05 ^a	3,09 \pm 0,08 ^a	2,8 \pm 0,3 ^a
AgNP F	113,0 \pm 4,1 ^b	82,3 \pm 1,7 ^a	3,7 \pm 0,4 ^b	32,0 \pm 2,8 ^b	32,9 \pm 1,8 ^b

Se informan los valores medios \pm la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como era de esperar, estas variaciones en los parámetros de cromaticidad y luminosidad hicieron que se vea afectada, inevitablemente, la diferencia de color (ΔE). La Tabla 3.2 muestra el ΔE obtenido para la formulación conteniendo las AgNP F y se puede observar un incremento significativo ($p < 0,05$) del valor en comparación con las películas nanocompuestas iniciales. Es evidente que las nanopartículas obtenidas por ablación láser, al ser más pequeñas y de un color amarillo intenso tienen un efecto significativo sobre los parámetros relacionados al color de los materiales que las contienen.

En la Figura 3.15a se presenta un espectro de absorción UV-vis de las películas de almidón de maíz con incorporación de AgNP F en donde se puede ver claramente la presencia del pico correspondiente a las nanopartículas de plata, como se mencionó en la sección 4.1. Este plasmón no fue evidente al registrar los espectros de las películas con AgNPs *in situ*. Sin embargo, Rhim y col. (2014) sí pudieron observar un pico de absorción alrededor de 420 nm en películas compuestas de agar/AgNPs sintetizadas por ablación láser.

En esta ocasión, los parámetros de capacidad de barrera al UV, opacidad y transparencia fueron significativamente menores ($p < 0,05$) con respecto a las formulaciones obtenidas con AgNP sintetizadas por métodos químicos (Figura 3.15b).

Esta caracterización hace pensar que a la hora de querer utilizarlos como envases para alimentos, probablemente no sean aceptados por los consumidores, ya que podrían alterar la percepción de la calidad del producto contenido.

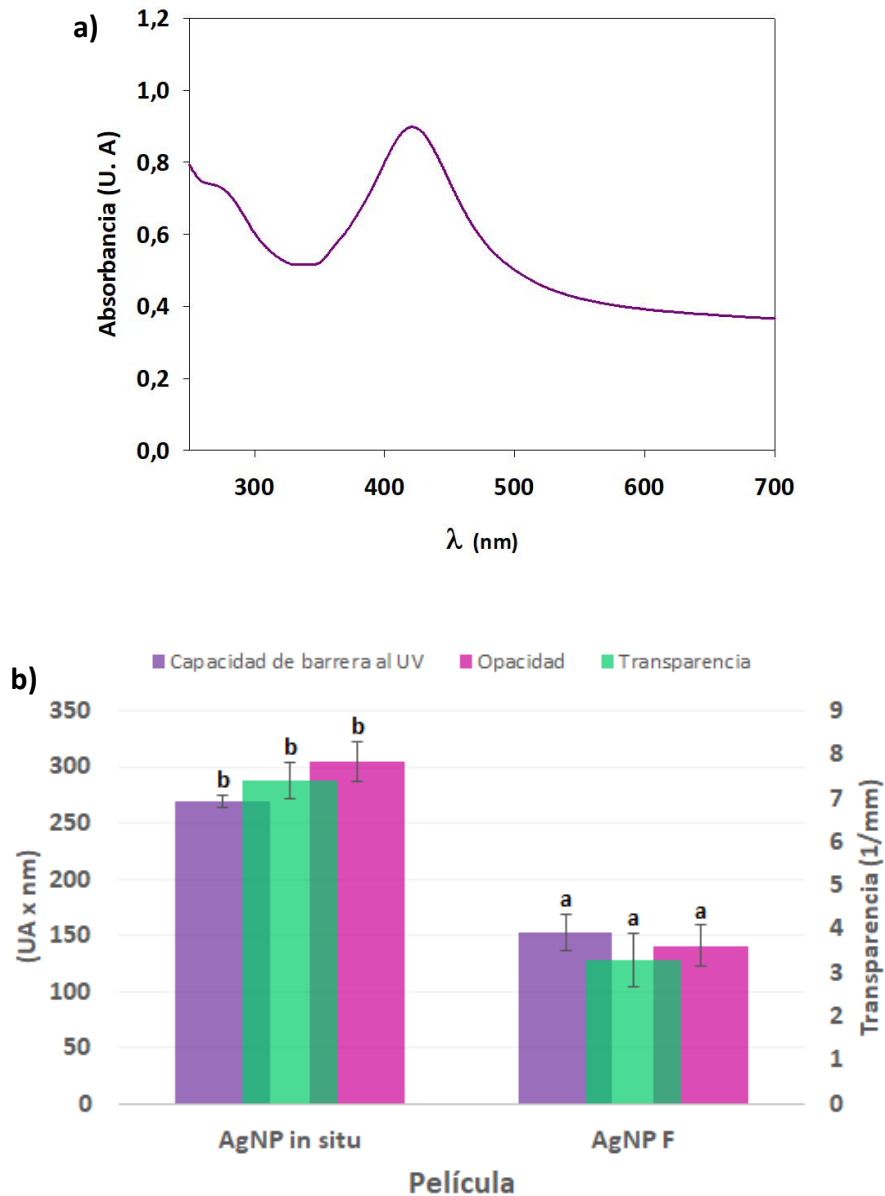


Figura 3.15: a) Espectro UV-vis de una película nanocompuesta con AgNP F. b) Capacidad de barrera al UV (UA x nm), opacidad (UA x nm) y transparencia (1/mm) de las películas nanocompuestas formuladas.

4.3.2. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La WVP de las películas nanocompuestas con nanopartículas de plata asistidas por ablación láser no difirió significativamente ($p > 0,05$) de las muestras conteniendo AgNPs *in situ* del Capítulo 1 (Tabla 3.3).

Como es sabido, la transmisión de vapor de agua a través de un material es el resultado de un equilibrio entre tres mecanismos principales (Ludueña y col., 2012), la cristalinidad del mismo, la tortuosidad del camino que debe recorrer el vapor dentro del espesor de la película, y la presencia de defectos superficiales o estructurales. Como se discutió con anterioridad en este trabajo de Tesis (Capítulo 1, Sección 4.3.3) la presencia de las nanopartículas aumenta la tortuosidad del recorrido para las moléculas de agua, pudiendo generar defectos en la matriz que faciliten el transporte de éstas a través de la película. También, las AgNPs pueden estar impidiendo la movilidad de las cadenas poliméricas en la matriz, lo cual puede inducir a una disminución en la permeabilidad al vapor de agua.

4.3.3. Solubilidad

La solubilidad de las películas es indicativa de su integridad en un ambiente acuoso, por lo tanto, cuanto mayor sea la solubilidad, menor será su resistencia al agua. Esta propiedad es un factor importante ya que, puede determinar la biodegradabilidad de las películas como material de envasado, o incluso se vuelve significativa cuando las películas entran en contacto con productos alimenticios de alta humedad y durante el almacenamiento.

Al evaluarse la solubilidad de los materiales obtenidos, se observó que, para las películas con AgNP F es significativo el efecto del aumento de la temperatura del medio (Figura 3.16). Asimismo, al comparar la solubilidad (a ambas temperaturas) de estas muestras con las películas conteniendo AgNPs *in situ* se puede ver que presentan diferencias. El incremento observado para las películas con nanopartículas de plata sintetizadas por ablación láser puede deberse a la menor cristalinidad de la matriz mencionada en la Sección 4.2.2 de este Capítulo, ya que la solubilidad es una consecuencia directa de la organización microestructural de un material, y en este sentido, la disminución en el grado cristalino lleva a que las películas se hinchen más fácilmente en agua y luego se desintegren; aumentando la solubilidad (Maizura, Fazilah, Norziah, y Karim, 2007).

El contenido de humedad para las películas de almidón de maíz con nanopartículas de plata obtenidas por ablación láser fue de $29,5 \pm 0,2$ %, valor ligeramente mayor al de su contraparte sintetizadas por la vía química.

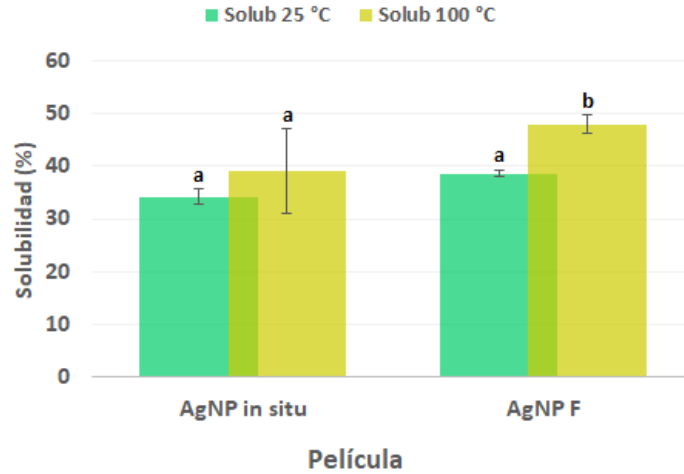


Figura 3.16: Comparación de la solubilidad a 25 y 100 °C de las películas nanocompuestas con AgNP obtenidas in situ y por ablación láser.

Tabla 3.3: Parámetros mecánicos y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas nanocompuestas.

Muestra	Elongación a la ruptura (%)	Esfuerzo (MPa)	Módulo elástico (MPa)	Trabajo (J)	WVP (10^{-10} g/m s Pa)
Control	32,7 ± 0,8 ^a	2,9 ± 0,2 ^a	3,7 ± 0,6 ^a	0,021 ± 0,001 ^a	2,9 ± 0,2 ^b
AgNP <i>in situ</i>	32,5 ± 0,7 ^a	5,8 ± 0,3 ^b	15,2 ± 0,3 ^a	0,063 ± 0,001 ^c	1,9 ± 0,1 ^a
AgNP F	43,2 ± 3,0 ^b	4,4 ± 0,9 ^a	14,2 ± 2,2 ^a	0,029 ± 0,008 ^b	1,6 ± 0,2 ^a

Se informan los valores medios \pm la desviación standard. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.4. Propiedades mecánicas

Los resultados correspondientes al porcentaje de elongación a la ruptura, esfuerzo de tensión, módulo elástico (indicador de la rigidez del material) y trabajo (relacionados con la energía de tracción necesaria para la romper la probeta), para las películas conteniendo AGNP F se presentan en la Tabla 3.3. En primer lugar se observó que los materiales desarrollados presentaron una mayor flexibilidad (determinada por el aumento en el parámetro de elongación) respecto a las películas obtenidas en el Capítulo 1 (AgNPs *in situ*), en este sentido es importante remarcar que las películas AgNP F presentaban un mayor contenido de humedad y que el agua es el plastificante

por excelencia de los sistemas hidrofílicos. Analizando el resto de los parámetros si bien no se evidenció un refuerzo de la matriz de almidón por incorporación de AgNP F respecto a las muestras con AgNPs *in situ*, si hubo una mejora respecto al control. En este sentido se puede suponer que la incorporación de las AgNP F genera una interferencia entre las cadenas de este biopolímero, haciendo que el material se vuelva más flexible. Un resultado similar fue descrito en el Capítulo 1 (Sección 4.3.4) al analizar las propiedades mecánicas de películas de almidón 1 % nanocompuestas. Asimismo, la significativa ($p < 0,05$) disminución en el esfuerzo mecánico respecto a los films con AgNPs *in situ*, se debe a que, como se mencionó anteriormente, las nanopartículas obtenidas por ablación se encuentran interfiriendo en la matriz, ya que tuvo que incorporarse un volumen significativo de suspensión de AgNP F para obtener en los materiales una concentración final equivalente a 143 ppm. Por otro lado, dado que el espectro ATR-FTIR presentado en la Sección 4.2.1 no muestra la formación de picos adicionales respecto a la película control, esto sugiere que si bien las NPs se incorporaron en la matriz, por los cambios observados en la región $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$ (flexión C-O-H) y las diferencias en las relaciones de intensidad de las absorbancias 1045/1022 o 1022/995, las interacciones entre las nanopartículas y la matriz de almidón no son lo suficientemente fuertes, lo que influye en las características mecánicas finales del material.

4.4. Evaluación de la viabilidad celular mediante la determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial

Los ensayos de viabilidad son fundamentales en el área de la toxicología ya que explican la respuesta celular frente a un agente potencialmente tóxico y también brindan información sobre la muerte, supervivencia celular y actividades metabólicas (AshaRani et al., 2009). Si bien los efectos citotóxicos de las AgNPs dependen de las líneas celulares empleadas, la línea Caco-2 es una de las más utilizadas como modelo para evaluar la toxicidad de los alimentos, y materiales de envasado, ya que permiten evaluar los potenciales efectos sobre el epitelio intestinal luego de la posible ingesta de nanopartículas. Además, factores como la forma, los recubrimientos superficiales (capping), el potencial zeta y tamaño también podrían ser cruciales en la toxicidad de

los AgNPs particularmente para las que tienen tamaños ≤ 10 nm (Liao y col., 2019; Palem y col., 2018; Yu y col., 2019). En la Figura 3.17 se pueden ver los resultados correspondientes al estudio del posible efecto citotóxico de los materiales nanocompuestos conteniendo AgNP F sobre las líneas celulares Caco-2 y Vero, observándose que éstos disminuían la viabilidad celular en aproximadamente un 33% para las células Caco-2 y en un 45% para las células Vero. Una posible explicación a estos resultados puede estar relacionado con el tamaño de las nanopartículas (6 nm), algunos autores establecen que cuanto menor es el tamaño de las nanopartículas, mayor es su efecto tóxico, ya que el tamaño de las AgNPs media las respuestas celulares, citotoxicidad, capacidad para atravesar las barreras biológicas y respuestas inmunológicas (Liu y col., 2010; Zhang, Wang, Chen, y Chen, 2014). Se podría esperar que las AgNP F al ser tan pequeñas tengan una actividad mayor debido a una mayor área superficial. Los factores que contribuyen a este fenómeno son: las AgNP más pequeñas exhiben una mayor capacidad de circular a través de las membranas plasmáticas hacia la célula; una vez internalizadas, tiene mayor relación superficie/volumen, facilitando la interacción con componentes celulares; y por último dado que la liberación de iones se correlaciona directamente con el área superficial y composición de los medios celulares, la tasa de liberación es mayor (Liu y col., 2010; Park y col., 2011).

Por otro lado, Zhang y col. (2014) describieron que los tipos celulares pueden influir en la respuesta frente a la acción de las AgNPs. Cuando se expusieron células de fibroblastos (NIH3T3) y células epiteliales de cáncer de colon (HCT116) a nanopartículas de plata, los dos tipos celulares presentaron diferentes respuestas, siendo las menos afectadas las epiteliales. Un resultado similar se puede ver en la Figura 3.17 en donde el porcentaje de viabilidad celular fue significativamente ($p < 0,05$) mayor para las células Caco-2 en comparación con las Vero.

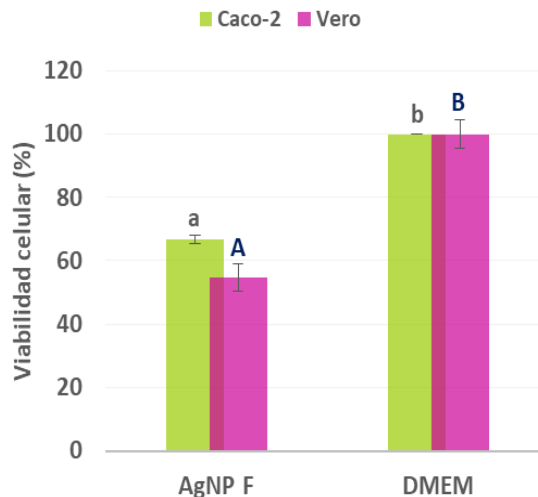


Figura 3.17: Viabilidad celular (%) de las películas conteniendo AgNP F frente a dos modelos celulares diferentes: Caco-2 y Vero; se incluye el control positivo con DMEM.

4.5. Análisis por componentes principales del efecto de la técnica de obtención de las AgNPs en las propiedades de los materiales nanocompuestos

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) incluyendo las características de las partículas obtenidas por técnicas de síntesis química (AgNP *in situ*) y física (AgNP F) y las propiedades más relevantes de los materiales nanocompuestos obtenidos a partir de ellas. Los resultados obtenidos se muestran como un gráfico bidimensional (biplot) en la Figura 3.18. La varianza total se pudo explicar a través de los componentes principales, la primera (CP1) describió el 70,7 % y la segunda (CP2) el 29,3 % restante.

La CP1 identifica a los materiales nanocompuestos y los separa de los controles, mientras que el CP2 está relacionado con la forma de obtención de las nanopartículas. La CP1 se correlaciona linealmente con las propiedades mecánicas, la solubilidad a 25 °C y de forma inversa con las relaciones de absorbancia de los picos de FTIR (relacionados con la proporción de fase amorfa-cristalina de las películas desarrolladas) y con la WVP. Por su parte la CP2 se correlacionó en forma directa con las características de las partículas obtenidas (diámetro y potencial ζ) y con la diferencia de color del material desarrollado. La correlación cofenética fue de 1,000 indicando que la agrupación de variables realizada fue excelente. Así el análisis por componentes principales fue una

herramienta muy útil que permitió integrar las características de las nanopartículas obtenidas por diferentes técnicas verdes de obtención con las propiedades relevantes de los materiales desarrollados que condicionarán su posterior aplicación.

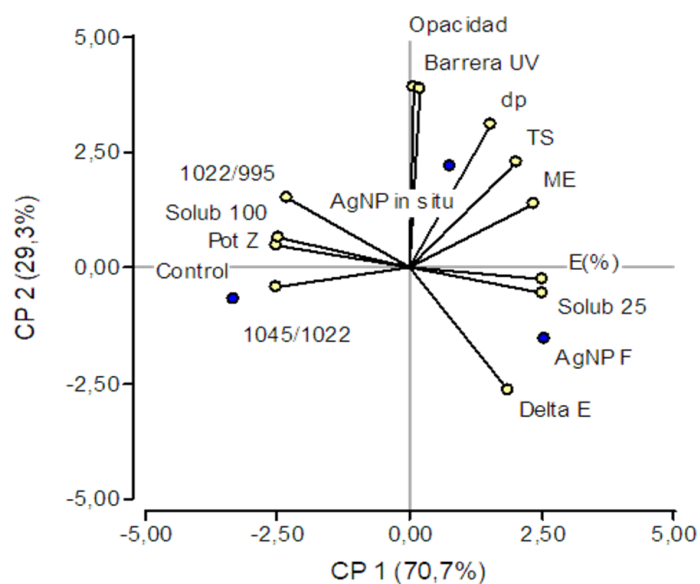


Figura 3.18: Gráfico Biplot resultante del análisis por componentes principales (ACP) de las propiedades más relevantes (puntos amarillos) de los materiales nanocompuestos conteniendo AgNP sintetizadas por vía química (AgNP *in situ*) y por ablación láser (AgNP F), se incluye a las películas control (puntos azules). Las propiedades analizadas fueron: WVP, ΔE , solubilidad a 25 y 100 °C, propiedades mecánicas (esfuerzo, TS, elongación, E% y módulo elástico, ME), opacidad, capacidad de barrera al UV, las relaciones de los picos de FTIR 1022/995 y 1045/1022, y características de las nanopartículas como el diámetro medio (dp) y el potencial ζ de las suspensiones que las contienen.

5. CONCLUSIONES

La ablación láser en medio líquido permitió obtener nanopartículas de plata (AgNP F) en corto tiempo ya que es una técnica simple que requiere pocos pasos.

El seguimiento de la formación de las NPs se realizó espectrofotométricamente obteniéndose el plasmón característico a 400 nm. La comparación de éste con los plasmones obtenidos para las AgNPs *in situ* y AgNP L mostró diferencias tanto en el

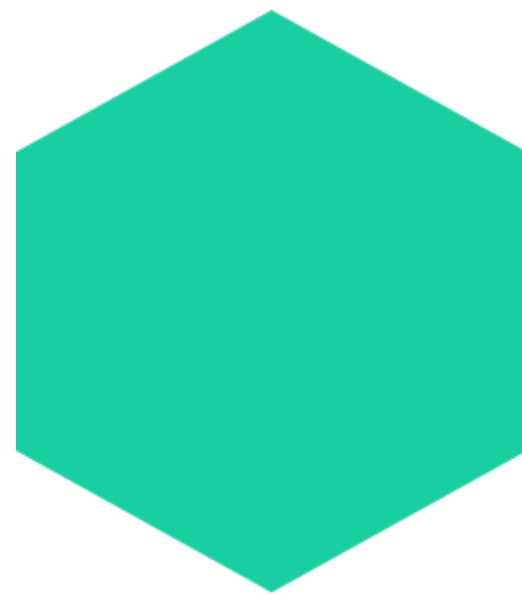
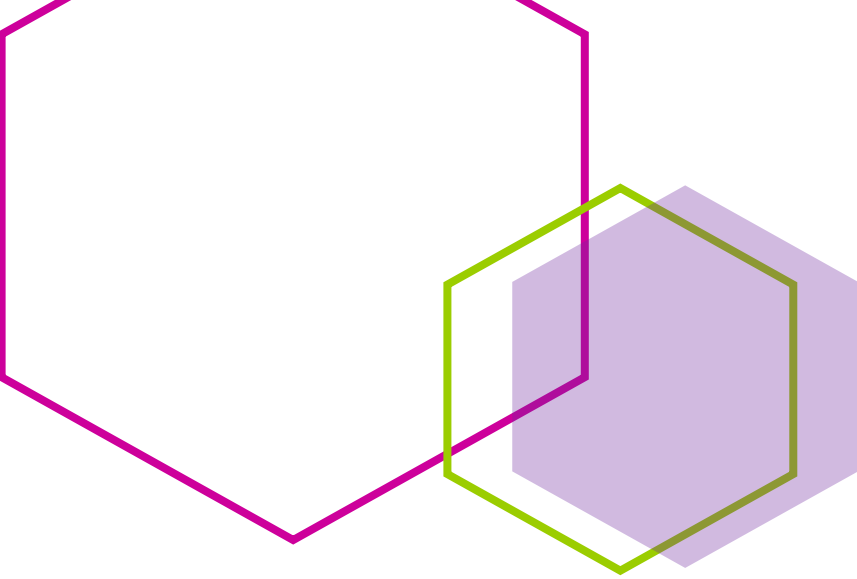
ancho como en la posición del máximo de absorbancia, infiriendo que las AgNP F sintetizadas eran monodispersas. Luego se pudo comprobar por TEM que las nanopartículas se encontraban bien dispersas en la solución de almidón, sin formar aglomerados y presentaban un radio medio de 3nm. Las medidas de potencial Z indicaron que las nanopartículas obtenidas por ablación láser resultaron ser más estables que las *in situ* y AgNP L.

Las AgNP F se pudieron incluir satisfactoriamente en la suspensión filmogénica de almidón al 3 % y se obtuvieron las correspondientes películas nanocompuestas con un tono amarillo intenso. La caracterización microestructural mostró que las nanopartículas se encontraban incluidas en la matriz y las imágenes de SEM mostraron que no estaban ejerciendo defectos en la película.

En general, el análisis de las propiedades finales de las películas nanocompuestas con AgNP F, indicó que éstas no generaban un efecto positivo con respecto a las películas conteniendo AgNPs *in situ*, particularmente no se evidenció el refuerzo de la matriz.

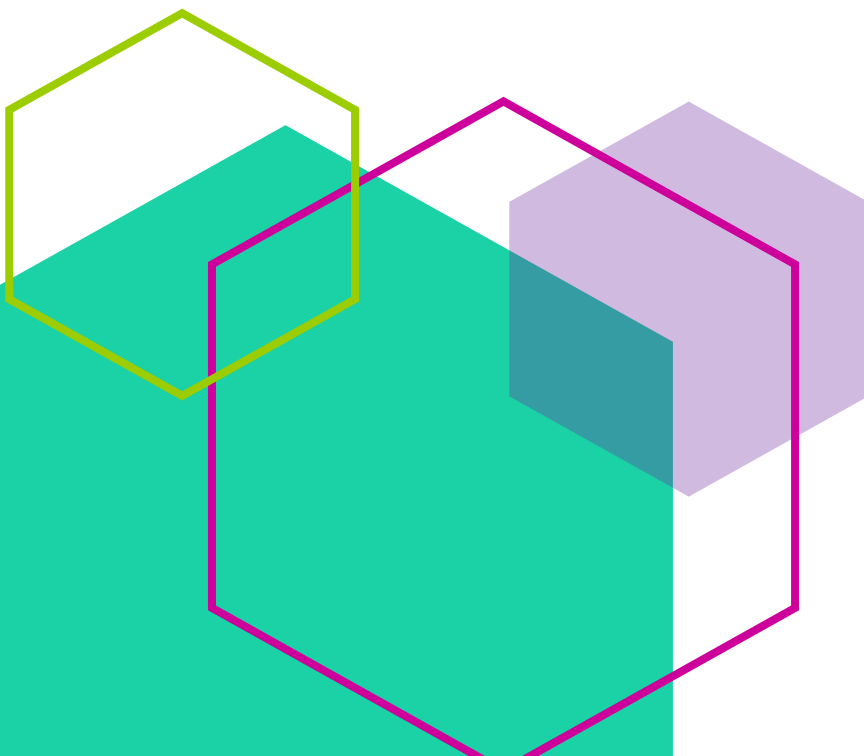
Las películas con AgNP F disminuyeron la viabilidad celular, siendo mayor este efecto sobre la línea celular Caco-2, la cual es una de las más utilizadas como modelo para evaluar la toxicidad de los alimentos, y materiales de envasado, ya que permiten evaluar los potenciales efectos sobre el epitelio intestinal luego de la posible ingesta de nanopartículas.

El ACP resultó ser una herramienta útil que permitió integrar las características de las AgNP sintetizadas por ablación láser con las propiedades relevantes de los materiales nanocompuestos.



CAPÍTULO 4

Propiedades relevantes que condicionan el uso de las películas nanocompuestas como envases sostenibles para alimentos



1. INTRODUCCIÓN

La producción de plásticos proviene principalmente de la industria petroquímica, que depende en gran medida de recursos petroleros no renovables. Por lo tanto, la producción masiva de plástico no solo causa una grave contaminación del medio ambiente, sino que también acelera el agotamiento de los recursos petroleros. Durante la última década, la creciente demanda de los consumidores por una vida más saludable ha estimulado la investigación sobre la relación entre el medio ambiente y la salud humana, ya que, se ha demostrado que una gran variedad de aditivos plásticos pueden tener incidencia sobre diferentes enfermedades (Cheng y col., 2021; Senthil y col., 2018). Una de las estrategias más efectivas para reducir el problema de la contaminación derivada de los plásticos es, desarrollar materiales biodegradables que puedan reemplazarlos. Es así que, en la actualidad la investigación sobre materiales biodegradables se centra principalmente en polímeros sintéticos y naturales.

Los materiales biodegradables son aquellos capaces de ser degradados en ambientes naturales. Representan una nueva generación de materiales capaces de reducir significativamente el impacto ambiental en términos de consumo de energía y generación de residuos después de su utilización. Los materiales biodegradables se clasifican en función de su mecanismo de degradación (Versino, 2017) en:

Biodegradables: son capaces de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua, componentes inorgánicos y biomasa, mediante la acción enzimática de microorganismos, la cual puede ser medida por tests estandarizados en un período específico de tiempo y bajo condiciones normalizadas de depósito. Las velocidades de biodegradación dependen enormemente del espesor y geometría de los materiales fabricados. Para películas de poco espesor generalmente se obtienen altas velocidades de degradación, mientras que los materiales más gruesos como platos, bandejas, etc, pueden necesitar tiempos más prolongados para degradarse biológicamente.

Compostables: pueden ser biodegradados y desintegrados en un sistema de compostaje, el cual debe cumplir con ciertos criterios de calidad tales como, bajo contenido de metales pesados, ecotoxicidad y la no-generación de residuos visibles.

Hidrobiodegradables/Fotobiodegradables: son aquellos polímeros degradados por un proceso de dos etapas, que supone una etapa inicial de hidrólisis o fotodegradación, seguida por una segunda etapa que involucra la biodegradación.

Bioaerodegradables: son polímeros capaces de ser degradados sin necesidad de la acción de microorganismos, al menos inicialmente. Este proceso se conoce también como desintegración abiótica e incluye procesos tales como disolución en agua y envejecimiento por luz o calor.

En las últimas dos décadas, se han realizado muchas investigaciones sobre biopolímeros para aplicaciones de envasado de alimentos (Arrieta, López, Ferrándiz, y Peltzer, 2013; Ceballos, Ochoa-Yepes, Goyanes, Bernal, y Famá, 2020; H. Cheng y col., 2021; Denavi et al., 2009; M. A. Garcia y col., 2006; López Olivia V., Castillo Luciana A., García M. Alejandra, Villar Marcelo A., y Barbosa Silvia E., 2015; Rivero, García, y Pinotti, 2009; Salgado, López-Caballero, Gómez-Guillén, Mauri, y Montero, 2013; Sarwar y col., 2018; Seligra y col., 2016) ya que deben lograr un transporte seguro, y que el producto llegue en condiciones adecuadas al consumidor, manteniendo sus propiedades físicas y químicas.

La pérdida de alimentos, está relacionada con la disminución de la calidad de los mismos en etapas posteriores de la cadena de producción debido a derrames o deterioro. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que en el mundo se echa a perder o se desperdicia alrededor de un tercio de los alimentos producidos, aproximadamente el 30% de la oferta alimenticia mundial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Por lo tanto, el gran desafío para la industria actual se enfoca en la conservación y seguridad alimentaria. Una solución eficaz para intentar sobrellevar esta problemática y reducir así la tasa de deterioro de los alimentos, es el desarrollo de envases activos. La posibilidad de controlar la formulación de las películas permite incorporar componentes, como agentes antimicrobianos, los cuales modifican la funcionalidad de los envases ampliando sus potenciales aplicaciones y transformándolos en activos (Tharanathan, 2003).

Así, los envases activos controlan varios aspectos que pueden jugar un papel importante en la determinación de la vida útil de los alimentos envasados tales como, procesos fisiológicos (respiración de frutas y hortalizas frescas), procesos químicos (oxidación lipídica), procesos físicos (deshidratación) y aspectos microbiológicos (deterioro ocasionado por acción de microorganismos). Mediante la incorporación de nanopartículas metálicas y/u otros aditivos antimicrobianos en envases en contacto con alimentos, la tasa de deterioro se puede reducir significativamente al extender la vida útil de los mismos (López y col., 2013; Noshirvani y col., 2017; Xu y col., 2018; Zhang y Jiang, 2020).

Para evitar definiciones que puedan llegar a generar confusión sobre lo que es un “*nanomaterial*”, la Comisión Europea (CE) en el año 2011 publicó una recomendación para la definición de estos materiales teniendo la intención de utilizarla en la legislación que el empleo de este tipo de materiales requeriría a futuro. Así, la CE define un *nanomaterial* como "el material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas, en estado libre, como agregado o aglomerado y donde, el 50 % o más de las partículas tengan un rango de tamaños entre 1 nm y 100 nm" (Recommendation 2011/696/EU of the European Commission of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial). Se estima que anualmente se producen 400 toneladas de AgNPs a escala mundial, y más del 25 % de los productos de consumo que contienen nanomateriales afirman tener plata en nanoescala (nAg). Debido a que estas nanopartículas son muy estudiadas por su capacidad antimicrobiana efectivamente demostrada (Westerband y Hicks, 2018), podrían incorporarse en matrices o contenedores de alimentos.

Al respecto, algunas investigaciones han informado que podría ocurrir migración de AgNPs desde los materiales nanocompuestos utilizados en los envases hacia los alimentos almacenados, lo que representaría una preocupación tanto para la salud del consumidor como para el medioambiente en su disposición final (Westerband y Hicks, 2018). Sin embargo, los ensayos de migración y la evaluación de los riesgos toxicológicos no son concluyentes al día de hoy, siendo necesarios nuevos estudios en este área tan crítica que podría limitar el uso de los materiales nanocompuestos en alimentos.

Los nanomateriales incorporados a los polímeros sintéticos pueden estar incluidos en la matriz, o unidos a la superficie pudiendo migrar a los alimentos con los que están en contacto a través de mecanismos de disolución en un simulante o alimento, difusión o transferirse por acción abrasiva de la superficie (Störmer y col., 2017). La medida en que se produce la migración depende de:

- las propiedades fisicoquímicas del compuesto que va a migrar, la matriz polimérica en la que se encuentra incorporado y las características de los alimentos con el que están en contacto (ej. contenido de grasa, pH ácido y contenido de alcohol).
- la temperatura.
- el tiempo y las condiciones de almacenamiento.
- el tamaño del envase en proporción a la cantidad de alimento (un envase pequeño tiene una relación superficie-volumen, mayor).

En general, el perfil de liberación depende de la geometría del sistema, de la naturaleza del polímero utilizado, del área del material, del espesor de la película, así como del tipo y características del componente activo. En consecuencia, la cinética de liberación está controlada por las propiedades de la matriz polimérica (geometría, peso molecular, cristalinidad y temperatura de transición vítrea) y por las características del propio compuesto activo (concentración inicial, interacciones agente activo-polímero, presión osmótica y solubilidad del compuesto activo incorporado). Otros factores que influyen son las características del medio en el que se va a realizar el ensayo de liberación, pH y temperatura.

Para determinar la migración de NPs desde el envase hacia los alimentos, comúnmente se utilizan simulantes alimenticios y no productos reales ya que su uso simplifica la detección, aproximándose a la situación real. Los simulantes de alimentos varían en función de sus propiedades químicas representando distintos tipos de alimentos: hidrofílicos (de base acuosa), lipofílicos (alimentos grasos) o anfifílicos (alimentos con propiedades tanto acuosas como grasas) (Picó, 2018).

El Código Alimentario Argentino (Tabla 4.1) establece una clasificación para los alimentos en contacto con los envases y según éstos, los posibles simulantes a utilizar para los ensayos de migración.

Tabla 4.1. Clasificación para los alimentos en contacto con los envases y sus posibles simulantes (Res. Conj. N°140 y N° 526, 17.9.2001, Res. GMC MERCOSUR N° 32/97 y N° 33/97)

ALIMENTO	SIMULANTE
Tipo I	A
Tipo II	B
Tipo III a	A, D
Tipo III b	B, D
Tipo IV	D
Tipo V	C
Tipo VI	Ninguno u ocasionalmente A, B, C o D, según el tipo de alimento

Donde los alimentos pueden ser de tipo: **I.** alimentos acuosos no ácidos (pH >5); **II.** alimentos acuosos ácidos (pH ≤ 5); **III: a.** alimentos acuosos no ácidos que contienen grasas o aceites. **b.** alimentos acuosos ácidos que contienen grasas o aceites; **IV.** alimentos grasos; **V.** alimentos alcohólicos (contenido de alcohol > 5% v/v); **VI.** alimentos secos o de acción extractiva poco significativa. Y los simulantes: **A.** agua destilada, **B.** solución de ácido acético al 3% (m/v) en agua destilada, **C.** solución de etanol al 15 % (v/v) en agua destilada o solución de etanol en agua destilada a la concentración más próxima a la real y **D.** aceite de oliva refinado; alternativo: n-heptano (I).

Mientras que, el Reglamento de la UE n° 10/2011 (Commission Regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Off J Eur Union. 15:12–88), dispone que pueden utilizarse seis simulantes alimentarios para las pruebas de migración de materiales en contacto con alimentos: (1) etanol al 10 % (v/v), (2) ácido acético al 3 % (v/v), (3) etanol al 20 % (v/v),

(4) etanol al 50 % (v/v), (5) aceite vegetal y (6) poli(2,6-difenil-p-óxido de fenileno). Estos simulantes representan: (1) alimentos con carácter hidrofílico; (2) alimentos con un carácter hidrófilo y con pH inferior a 4,5; (3) alimentos alcohólicos con un contenido de alcohol de hasta 20 %; (4) alimentos alcohólicos con un contenido de alcohol mayor al 20 % y alimentos con carácter lipofílico/emulsiones de aceite en agua; (5) alimentos lipofílicos con grasas libres en la superficie y (6) alimentos secos, respectivamente.

Esta reglamentación de la UE es la más completa que existe actualmente (Reglamento de la UE nº 10/2011) y contiene más de 1000 compuestos autorizados, incluyendo los nanomateriales que se pueden utilizar en contacto con alimentos. El *límite de migración global* utilizado para sustancias que migran desde el material de envase, directamente al alimento, es de 10 mg de constituyente por dm^2 de superficie y se aplica a la suma de todas las sustancias que pueden migrar al alimento (o simulante alimentario). Por ejemplo, para un envase cúbico que contiene 1 Kg de alimento, equivale a una migración de 60 mg de sustancia por kg de alimento. Los productos también pueden tener *límites de migración específicos*; estas sustancias deben identificarse mediante técnicas analíticas. En el caso de las nanopartículas, la falta de herramientas para evaluar la exposición, es una gran limitante. Además, excepto algunos materiales específicamente enumerados en la legislación, la evaluación del riesgo de los nanomateriales debe analizarse caso por caso, ya que, estos pueden tener propiedades químicas y físicas diferentes a los de un material convencional, y por lo tanto, propiedades toxicológicas diferentes y no comprendidas en su totalidad hasta la fecha.

El riesgo toxicológico para los seres humanos de cualquier sustancia, incluidos los nanomateriales, es siempre una combinación del riesgo propio de la sustancia en cuestión y su exposición al consumidor. Por ejemplo, para la exposición por vía oral, hay una gran diferencia si el nanocompuesto actúa como aditivo alimentario, o si se utiliza junto con otro material en contacto con los alimentos, desde donde va a tener que liberarse al alimento para que pueda ser evaluada su toxicidad. Por eso es muy importante poder distinguir entre nanomateriales integrados o libres (Störmer y col., 2017). A pesar de esto, y debido al aumento en la utilización de nanopartículas en varios productos de consumo cotidiano, se incrementa la exposición tanto humana como

ambiental, por lo que el riesgo pasa a estar relacionado con su toxicidad a corto y largo plazo.

Numerosos estudios han revelado que las nanopartículas pueden penetrar en las células y afectar la respiración celular inactivando las enzimas esenciales, afectando los grupos tiol en los residuos de cisteína y, mediante la producción de radicales tóxicos como superóxido, peróxido de hidrógeno e iones hidroxilo (Böhmert, Niemann, Thünemann, y Lampen, 2012; Liao y col., 2019a; Song y col., 2014). Pero hay que tener en cuenta que los resultados *in vitro* pueden diferir de los *in vivo*.

Chen, Cui, Tu, Gu, y Chi, (2011) han demostrado que la biodistribución en experimentos *in vivo* con ratones depende del tamaño de la sustancia citotóxica desde cationes metálicos a micropartículas y nanopartículas. Las NPs ingeridas deben atravesar diferentes entornos fisiológicos con características fisicoquímicas particulares (el tracto gastro-intestinal) antes de llegar a las células intestinales. En este recorrido se exponen al contacto con la saliva y jugos gástricos e intestinales. Durante el proceso digestivo, los parámetros fisiológicos como el pH, la fuerza iónica, así como el contenido y la composición de proteínas pueden cambiar varias veces, y es probable que el tamaño, la forma, la estabilidad o el estado de agregación de las nanopartículas se vean afectados y, por lo tanto, también podría verse afectado su potencial citotóxico.

2. OBJETIVOS

En relación con la aplicación propuesta para las películas nanocompuestas como envases sostenibles de alimentos de humedad intermedia, se propuso evaluar las siguientes características que podrían condicionar su uso:

- Toxicidad, particularmente la citotoxicidad de los nanomateriales desarrollados en tres líneas celulares.
- Migración de las nanopartículas de plata de los materiales nanocompuestos desarrollados hacia distintos simulantes alimentarios, estudiando además la cinética de dicho proceso y los mecanismos operantes.
- Biodegradabilidad de los biopolímeros nanocompuestos en condiciones de compostaje.

- Estimación de los posibles costos de producción e indagación sobre la legislación vigente en relación al uso de nanomateriales que contienen AgNPs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los ensayos a desarrollar en el presente Capítulo se utilizaron reactivos de grado analítico, y las soluciones de los reactivos mencionados fueron preparadas con agua ultrapura con una resistencia específica de 18 MΩ.

3.1. Toxicidad de los materiales nanocompuestos, migración, y biodegradación

3.1.1. Toxicidad de los materiales nanocompuestos

La toxicidad de los materiales nanocompuestos y sus respectivos controles se determinó mediante la evaluación de la viabilidad celular sobre las líneas celulares mencionadas en el Capítulo 3, Sección 3.4: células Caco-2/TC7 y Vero.

Asimismo, en este Capítulo se incluyó la línea celular THP-1 (ATCC® TIB-202™). Esta es una línea monocítica humana proveniente de un paciente pediátrico con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya y colet al., 1980). El uso de ciertos agentes como el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) permite la diferenciación a macrófagos. Se utiliza como modelo de célula fagocítica profesional (Daigneault y col., 2010).

Estas células se crecieron en medio DMEM adicionado con 10% SFB, aminoácidos y antibióticos (como fue descrito para las células Caco-2/TC7) y glutamax 2mM (Life Technologies) a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂. La diferenciación a macrófagos se realizó utilizando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma, Saint Louis, EE.UU.SA) en una concentración final de 200 nM durante 48 hs en las condiciones de crecimiento descritas previamente en la Sección 3.4 del Capítulo 3. La concentración de células utilizadas para la diferenciación en las placas de cultivo fue de 1,3 10⁶ células/mL. También se utilizaron células sin diferenciar (monocitos) en la misma concentración y condiciones de crecimiento.

Como se mencionó en el Capítulo 3, Todas las líneas celulares se encuentran conservadas en nitrógeno líquido en el correspondiente medio de cultivo adicionado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para su uso se descongelaron en baño de 37°C, se

centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y el pellet de células se resuspenden en el medio correspondiente para cultivar en botellas de cultivo celular. Las líneas Caco-2/TC7 y Vero se usan como máximo durante 10 pasajes y la línea THP-1 se usa durante 5 pasajes; luego de lo cual se parte de un nuevo stock. Este ensayo fue realizado en colaboración con la Dra. Minnaard del CIDCA.

3.1.1.1. Evaluación de la viabilidad mediante la determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial

El ensayo se llevó a cabo tanto para las células Caco-2/TC7 como para las Vero, por lo tanto, previa incorporación de las películas, las células tuvieron tiempos de incubación diferentes siendo 7 días para las Caco-2/TC7 y 48 h para las Vero. Las células crecidas en placas de cultivo se lavaron 2 veces con PBS (buffer fosfato salino) y a cada fosa se le adicionaron 200 μ L de DMEM adhesión (medio sin agregado de suero ni antibióticos) y las películas a ensayar por triplicado (AgNP 0 ppm, AgNP 143 ppm, AgNP L 71,5 ppm, Control L 71,5 ppm y AgNP F) las cuales se cortaron en cuadrados de 5x5 mm² y se esterilizaron con luz UV durante 5 min de cada lado (la esterilidad se comprobó previamente mediante incubación en caldo cerebro corazón 48 hs a 37°C). Las placas se incubaron durante 1h y 24 h a 37 °C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo de contacto se descartaron las películas, se realizaron 3 lavados con PBS, se agregaron 250 μ L de MTT (0,5 mg/mL) y se incubó durante 2 h a 37 °C para que ocurra la reducción del reactivo por las células que se encuentren viables. Posteriormente, se retiró el MTT cuidadosamente, se añadió DMSO y se midieron los valores de densidad óptica (DO) utilizando un lector de placas Synergy HT fluorescence microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.) a 550 nm. El porcentaje de viabilidad celular se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular = \left(\frac{Am}{Ac} \right) \times 100 \quad [4.1]$$

Donde, Am= absorbancia de la muestra y Ac= absorbancia del control. El ensayo se realizó al menos por triplicado.

3.1.1.2. Evaluación de la viabilidad mediante tinción con yoduro de propidio

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar y cuantificar de manera simultánea múltiples características celulares a medida que son transportadas en un fluido e incididas por un haz de luz. El citómetro de flujo mide el tamaño y la granularidad de la célula, así como la fluorescencia relativa de la misma. Estas características se determinan usando un sistema óptico acoplado a un procedimiento electrónico que registra la manera en que la célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia (Marti, Stetler-Stevenson, Bleesing, y Fleisher, 2001). Gracias a este sistema óptico, se puede conocer el tamaño y la granularidad de la célula, así como las proteínas que se expresan (marcadores), permitiendo la identificación de diferentes tipos celulares. Cuanto mayor sea el número de detectores con los que cuente el equipo, mayor será su capacidad para identificar poblaciones celulares diferenciadas (Hoffman, 2008). La Figura 4.1 esquematiza el principio de funcionamiento de esta técnica.

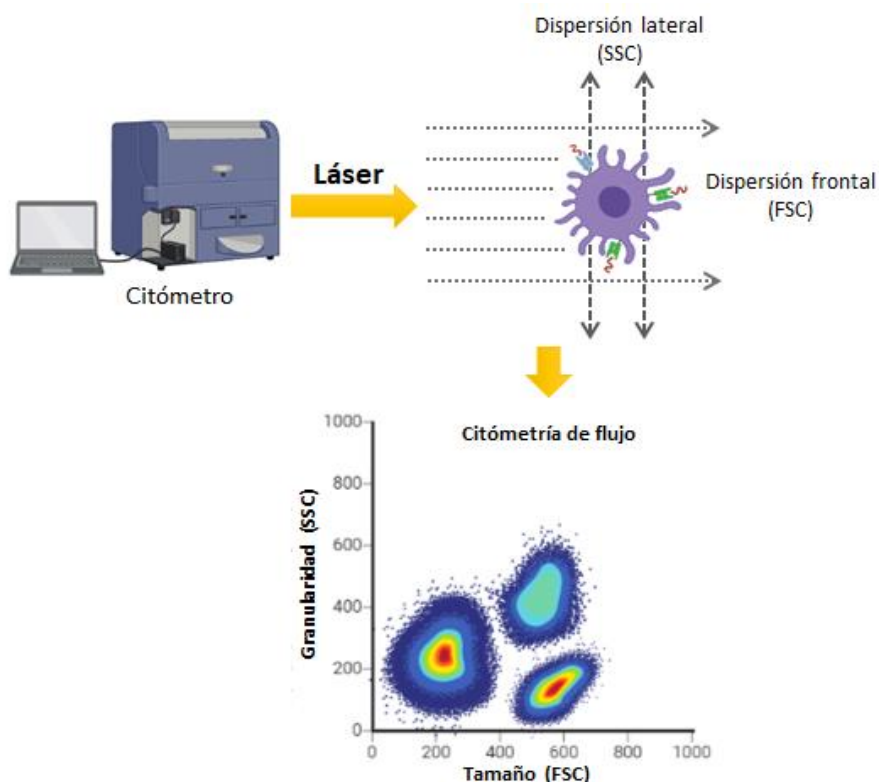


Figura 4.1: Esquema del funcionamiento del citómetro de flujo y representación gráfica utilizando el programa FlowJo™ acoplado al equipo.

En relación al procedimiento realizado en el laboratorio, las células THP-1 diferenciadas con PMA en placa de 24 fosas se lavaron 2 veces con PBS y se colocaron las películas cortadas como se mencionó anteriormente por triplicado en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - ampliamente utilizado para favorecer el crecimiento de diferentes tipos de células-) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron a 37 °C durante 24 h en atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo, se retiró la película, se desprendieron las células de la placa de cultivo, y se trasvasó el contenido de cada pocillo, a tubos de citómetro para proceder a su lavado con PBS frío (3 veces). Entre cada lavado los tubos se centrifugaron 5 min a 1500 g. Finalizada la etapa de lavado, se resuspendieron las células en PBS para su evaluación por citometría de flujo.

Cuando se utilizaron células THP-1 sin diferenciar (monocitos) las mismas se centrifugaron 5 min a 1500 g y se renovó el medio DMEM 10 % SFB, colocándose 0,5 mL por pocillo de una suspensión $1,3 \times 10^6$ células/mL en placa de 24 fosas. Sobre esta suspensión se agregaron las películas por triplicado y se incubó 1 o 24 h a 37 °C en 5% CO₂. Luego de la incubación, el contenido de cada pocillo se trasvasó a un tubo de citometría, se retiró la película, se lavó 3 veces con PBS frío (como se indicó previamente para las células THP-1 diferenciadas) y se resuspendieron en 200 µL de PBS para su análisis por citometría de flujo.

Se determinó la viabilidad celular por agregado de ioduro de propidio (IP) a concentración final 1 µg/mL por tubo inmediatamente antes de analizar las células por citometría de flujo. Este agente se intercala en el ADN de aquellas células que sufrieron alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, diferenciando así las células necróticas o apoptóticas de aquellas que mantienen la integridad de su membrana.

El análisis de las muestras se realizó en un citómetro FACSCalibur™ (BD Biosciences, CA, EE. UU.) equipado con el software CellQuest™. En un gráfico de granularidad celular (Dispersión Lateral del inglés *Side Scatter*, SSC) vs tamaño celular (Dispersión Frontal del inglés *Forward Scatter*, FSC), (Figura 4.1), se seleccionó la población de células sobre las que se determinó el porcentaje de células teñidas de rojo (FL2+) en un gráfico de células

teñidas de verde (FL1) vs teñidas de rojo (FL2). El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa FlowJo™ V10.4.

En todos los casos se utilizaron controles positivos de viabilidad, correspondiendo a las células en medio DMEN sin películas. Los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

3.1.2. Evaluación de la migración de nanopartículas a simulantes alimentarios

La distinción entre los términos liberación, migración y difusión es crucial para una adecuada interpretación de los resultados correspondientes a esta Sección. En la mayoría de los casos, cuando se usa el término *liberación* se lo hace con una connotación positiva, ya que generalmente es una característica que se busca que ocurra en forma controlada en ciertos materiales que incluyen sustancias activas, como por ejemplo, la liberación de polifenoles de extractos de romero de películas de almidón de mandioca (Estevez-Areco y col., 2019). Por el contrario, la expresión *migración* se utiliza, normalmente, para referirse a la transferencia de componentes (aditivos o contaminantes en algunos casos) desde los materiales hacia los alimentos (o simulantes) con los que están en contacto, en las condiciones habituales de empleo, elaboración y almacenamiento, y/o en las condiciones equivalentes de ensayo (Pico, 2018). Finalmente, la *difusión* es uno de los mecanismos propuestos para la transferencia de masa a la hora de estudiar los procesos de liberación o migración.

Si bien la difusión es uno de los procesos más estudiados, al analizar la migración de NPs desde una matriz polimérica se pueden encontrar otros mecanismos como desorción superficial, disolución de iones, hinchamiento y la degradación del polímero por erosión, entre otros, ya que en algunos casos puede ser más complejo.

En la Figura 4.2 se esquematizan algunos de los posibles mecanismos para el proceso de liberación/migración de un compuesto activo, en este caso AgNPs, desde la matriz polimérica. La difusión hace referencia al movimiento del activo impulsado por un gradiente de concentración (Fredenberg, Wahlgren, Reslow, y Axelsson, 2011), mientras que la disolución se da cuando, el sistema portador (nanocompuesto, en esta ocasión) se encuentra con un entorno con condiciones termodinámicamente compatibles, y el activo (NPs) se libera al medio (McClements, 2014). Sin embargo, distinguir la disolución de la difusión no es tan sencillo, ya que el disolvente puede implicar eventos de erosión

o hinchamiento de la matriz polimérica y, por lo tanto, aumentar la velocidad de difusión (Boostani y Jafari, 2021; McClements, 2014). En el hinchamiento la liberación/ migración se produce debido a la absorción del solvente del medio y, por tanto, al hinchamiento de la matriz. La velocidad de liberación/migración puede depender tanto de la velocidad de hinchamiento como del tiempo necesario para que el activo difunda a través del sistema hinchado (McClements, 2014). Al hablar de degradación o erosión en un sistema polimérico, la liberación del agente activo se debe a la disolución del sistema sin que ocurran eventos de transporte (McClements, 2014). En los polímeros hidrofílicos suele ocurrir erosión homogénea y la difusión puede incrementarse por los poros creados a través de este mecanismo.

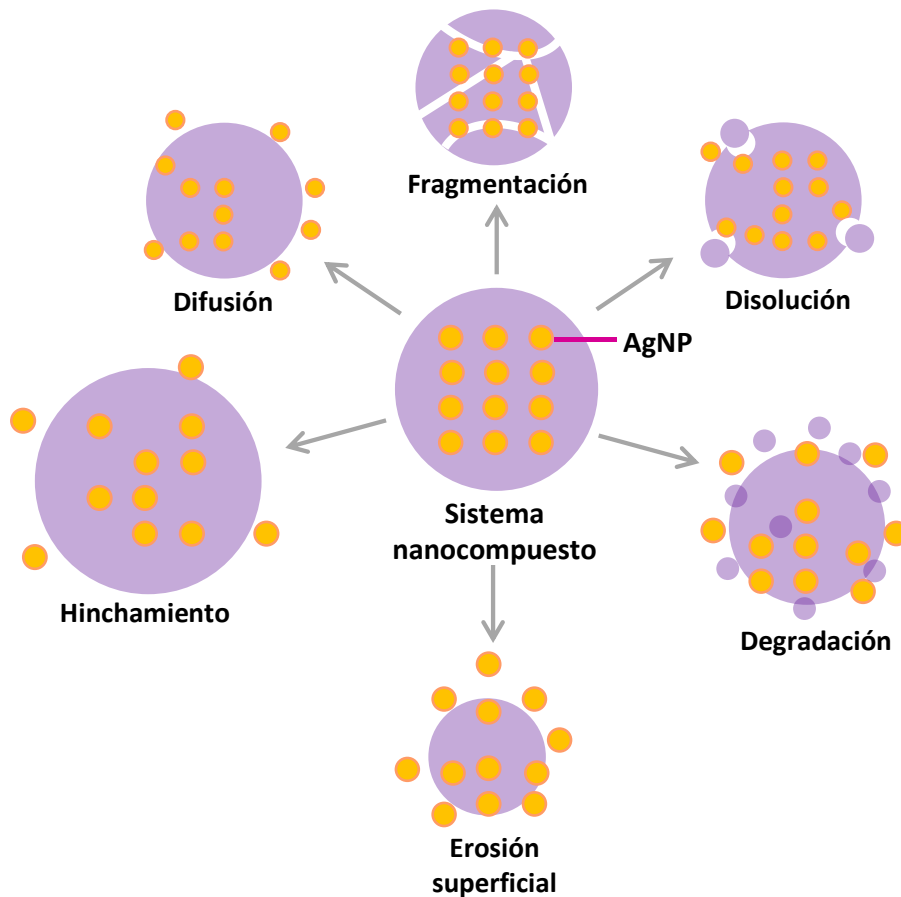


Figura 4.2: Esquema que representa los diferentes mecanismos de migración de AgNPs en una matriz polimérica.

Finalmente en la *fragmentación*, el agente activo se libera cuando el sistema se agrieta o rompe debido a diversas condiciones ambientales, que incluyen presión, cizallamiento, alteraciones del pH y/o actividades enzimáticas (Boostani y Jafari, 2021). La velocidad de liberación está controlada en este caso, por las características de la fractura, la forma y el tamaño de los fragmentos formados. Es probable que los activos se liberen finalmente desde los fragmentos a través de mecanismos como la difusión, disolución o erosión. Debido a la creación de fragmentos pequeños y el consiguiente aumento de la superficie, suele haber tasas de liberación más rápidas en estos casos (McClements, 2014).

La posible migración de AgNPs de los materiales desarrollados en los Capítulos 1 y 2 se estudió a partir de la inmersión total de películas nanocompuestas (AgNPs 143 ppm y AgNP L 71,5 ppm) en medios simulantes. Debido a que los simulantes alimentarios se utilizan para simplificar las matrices de los alimentos, y las condiciones de prueba deben ser equivalentes a condiciones de uso más exigentes del material, se escogieron tres simulantes acuosos: agua, etanol 15 % v/v, y ácido acético 3% v/v (Res. Conj. N°140 y N° 526, 17.9.2001, Res. GMC MERCOSUR N° 32/97 y N° 33/97). Siguiendo el protocolo descrito por Kim y col. (2019), y para mantener la relación área-volumen establecida por los autores, se cortaron películas de 1,2 x 2,7 cm² y se colocaron en tubos falcon de 15 mL, conteniendo 13 mL del simulante correspondiente. La determinación se llevó a cabo por duplicado a 35 °C en un agitador orbital (Orbit-Environ Shaker, Lab-Line Instruments, EE. UU.) con agitación suave (125 rpm) y se tomaron muestras a los siguientes tiempos de contacto: 1, 2, 4, 8, y 24 h, 3, 5 y 7 días (Figura 4.3). La elección de la temperatura del ensayo está de acuerdo con lo sugerido por la norma Europea, UE 221 2016/1416 (Reglamento (UE) no 10/2011 de la comisión, 1 (2011), (Leites Luchese, y col., 2021). Transcurridos los tiempos de contacto mencionados, se retiraron las películas y los simulantes se analizaron mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés). Esta técnica se seleccionó debido a que la concentración de plata a determinar es muy baja y además la ICP-OES permite cuantificar los elementos de la tabla periódica en el orden de los ng/L-mg/L (ppb-ppm, respectivamente). Para tal fin, fue necesario realizar algunas modificaciones

al protocolo que normalmente se utiliza, particularmente en lo referido a la digestión de las muestras.

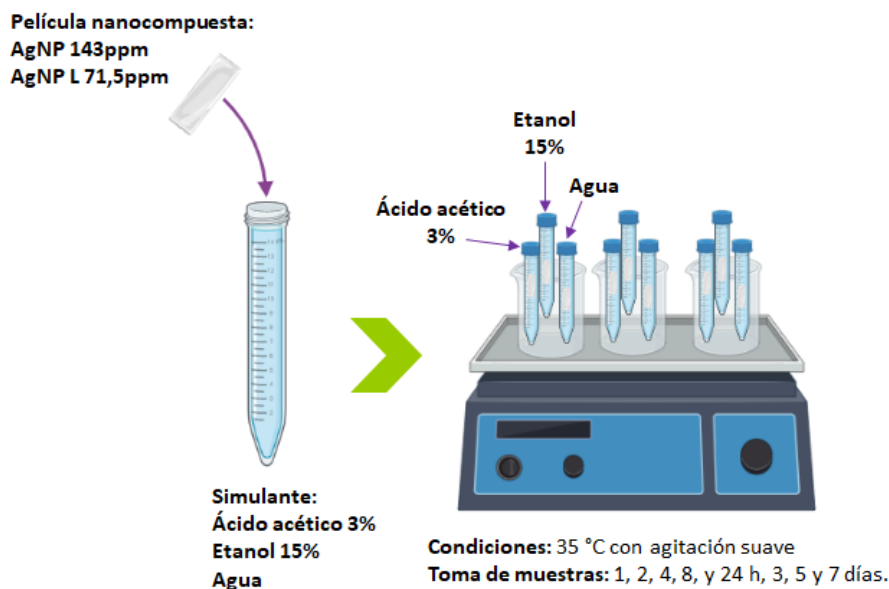


Figura 4.3: Esquema representativo del ensayo de migración realizado en este trabajo de Tesis.

Para ello, es necesario realizar una etapa de acondicionamiento que tiene por objetivo transformar una muestra, que puede ser compleja y eventualmente sólida, en una muestra líquida (para poder ser aspirada y nebulizada), eliminando la materia orgánica y homogeneizando la misma para asegurar representatividad. Este procedimiento se conoce como mineralización de la muestra.

En este Trabajo de Tesis se eligió como técnica de mineralización la Digestión Asistida por Microondas (DAM) porque tiene la ventaja de poder trabajar a temperaturas más altas y en condiciones de confinamiento lo que permite una mayor recuperación de la muestra, tiempos de digestión más cortos y la imposibilidad del ingreso de contaminantes.

Las digestiones fueron realizadas con HNO₃ (65% p/p) de alta pureza ya que, a altas temperaturas tiene la capacidad de oxidar la materia orgánica y descomponer

fácilmente los hidratos de carbono. Sin embargo, debido a su escaso poder oxidante se agregó H₂O₂ 100 vol para asegurar la digestión completa.

La tolerancia a la presión de los contenedores herméticos de teflón, limitan la cantidad máxima de materia orgánica que puede digerirse a 0,25 g para digestiones rápidas y 0,50 g si la rampa de digestión es más lenta. A fin de reducir el contenido de materia orgánica y poder digerir una mayor cantidad de muestras, las de los ensayos con el simulante alcohólico se introdujeron dentro de los contenedores, y a continuación se colocaron en estufa a 37 °C para permitir la evaporación del componente orgánico del simulante. Esta temperatura fue elegida considerando tanto el punto de ebullición del etanol como el *flash point* (punto de inflamabilidad) del simulante a fin de garantizar la seguridad del ensayo. Mediante pesadas sucesivas se determinó que, luego de 16 h las muestras alcanzaban un peso constante, así a fin de estandarizar el protocolo las muestras permanecieron en la estufa durante 24 h.

En el caso del simulante ácido, por ser éste menos volátil que el alcohólico, la estrategia para disminuir la materia orgánica fue, colocar el simulante con los reactivos de digestión dentro de los contenedores cerrados herméticamente y realizar una pre-digestión a baja temperatura en estufa durante 24 h.

Finalmente se realizó la etapa de digestión asistida por microondas elevando la temperatura hasta 180 °C y dejando durante toda la noche hasta que los contenedores se enfríen para luego filtrar y llevar a volumen.

Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando un Espectrómetro de Plasma de Emisión Óptica Inductivamente Acoplado (ICP-OES) modelo ICPE-9820 (Shimadzu, Japón) acoplado con un Automuestreador automático ASX-520 (CETAC Technologies), mientras que las digestiones fueron realizadas con un digestor de microondas de 12 posiciones QLABPro Mca Questron (Horiba, Japón). Los datos experimentales se regresionaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo y col., 2020). En todos los casos se estimó la bondad de ajuste al modelo propuesto y los parámetros correspondientes a cada modelo.

3.1.3. Evaluación de la biodesintegración de las películas en suelo

La biodesintegración de las películas en suelo se estudió en condiciones de compostaje, utilizando tierra fértil como sustrato. Se cortaron muestras de 3 x 3 cm² las que se colocaron en mallas plásticas con entramado fino y se enterraron a una profundidad de 5 cm desde la superficie a fin de asegurar la degradación aeróbica de las mismas. Previamente se determinó el contenido de humedad de las películas como se describió en el Capítulo 1. Se utilizaron recipientes de 120 cm³ los cuales fueron acondicionados a temperatura y humedad relativa controlada (20 °C y 60 %HR, respectivamente); estas condiciones se tomaron como condiciones ambientales medias. Como agente de degradación se utilizó la propia microflora presente en la tierra utilizada, la cual presentaba las siguientes características, según el proveedor, Bertinat (Bertinat & Asociados S.R.L., Argentina):

Componentes	Porcentaje (%)
Tierra negra de campo	60
Abono animal estacionado	20
Materia orgánica vegetal	10
Perlita	10

Composición	%
Humedad	19-24
Materia orgánica	8-13
Relación C/N	14,6
N Total	0,5
Cenizas	75,8
pH	6,5-7,0

Siguiendo la metodología descrita en la Norma ASTM D5988-03 se adiciona 1 g de compost cada 25 g de tierra. La composición del compost utilizado, según el proveedor (Bertinat & Asociados S.R.L.) fue:

Composición	Porcentaje (%)
Materia orgánica	20-25
pH	5,0-5,5
Relación C/N	19,8
Cenizas	20-25
Humedad	45-50

Con el fin de mantener la humedad del suelo, los recipientes fueron regados diariamente con un rociador utilizando agua de red (aproximadamente 3 mL por recipiente). El seguimiento de la biodegradación de las películas se evaluó a través de la pérdida de peso de las muestras durante el período de degradación. Algunos autores establecen que la variación del peso es un buen indicador de la degradabilidad de los materiales poliméricos (Arrieta y col., 2014; Ishigaki y col., 2004; Ludueña y col., 2012). La pérdida de peso (%) se determinó una vez que las muestras fueron desenterradas y se limpiaron cuidadosamente con un pincel de cerdas suaves para no dañar la estructura, y así minimizar los errores asociados a la cuantificación de impurezas y/o partículas ajenas a la matriz. Semanalmente se retiraron muestras por duplicado para hacer un seguimiento del grado de avance de la degradación de los materiales en condiciones de compostaje. En la Figura 4.4 se presenta un esquema representativo del ensayo para la evaluación de la biodesintegración utilizado.

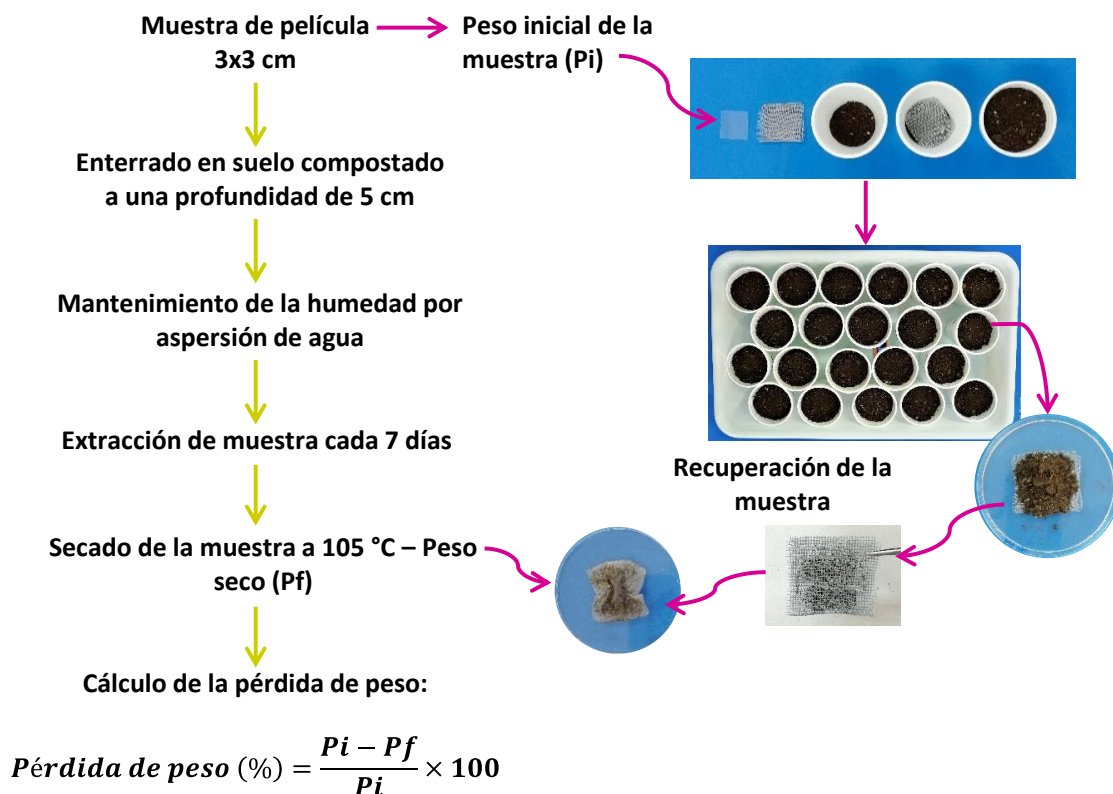


Figura 4.4: Esquema representativo del ensayo de biodesintegración realizado para este trabajo de Tesis.

3.1.3.1. Germinación de semillas

Con el fin de evaluar si los productos de la degradación de los materiales nanocompuestos afectan la calidad del compost se realizaron ensayos de cultivo de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Se ha informado que tanto las semillas de lechuga como de nabo (*Brassica rapa*), son adecuadas para este fin ya que son especies de rápido crecimiento y muy susceptibles a fitotóxicos (Huerta Muñoz, 2015). Las semillas de lechuga (CIA Agroparque S.R.L, Argentina) se sembraron en diferentes macetas que contenían los restos de compost de las muestras degradadas (al final del período del ensayo de biodegradación), previa homogeneización de las mismas. Se regaron las macetas y se dejó que las plantas se desarrollen al aire libre. Se determinó la capacidad de las semillas de germinar y desarrollar las plántulas. Se utilizó compost sin uso como control, los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

3.2. Análisis estadístico

Se realizaron análisis multifactoriales de varianza mediante el uso del software Systat (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, EE. UU.) versión 10.0 e InfoStat versión 2017 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). 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 $\alpha=0,05$. También se empleó el programa mencionado para el cálculo de regresiones lineales y no lineales.

Por otra parte, se llevó a cabo el Análisis por Componentes Principales (ACP) con el fin de analizar la interdependencia entre las características de las nanopartículas obtenidas por diferentes técnicas y la citotoxicidad de los materiales desarrollados a partir de éstas. Asimismo, se interrelacionaron las variables mencionadas y las propiedades relevantes de los materiales nanocompuestos y sus respectivos controles. A tal fin se empleó el Software estadístico InfoStat antes mencionado considerando dos componentes. Del análisis realizado se informó el gráfico Biplot y el valor del coeficiente de correlación cofenética obtenidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Toxicidad de los materiales nanocompuestos

4.1.1. Evaluación de la viabilidad mediante determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial

Como ya es sabido, las AgNPs se vienen utilizando ampliamente para aplicaciones antibacterianas y terapéuticas, incluyendo tejidos, apósitos para heridas y terapias contra el cáncer, llevando a una mayor exposición de las NPs a las células humanas (Liao, Li, y Tjong, 2019b). Debido a su amplia implementación se han intentado dilucidar los posibles mecanismos de captación de las nanopartículas por parte de las células (Figura 4.5), aunque ninguno de ellos se conoce con exactitud, los reportes bibliográficos sugieren procesos de difusión (translocación), endocitosis o fagocitosis (Zhang y col., 2021). Al entrar en el citoplasma, las AgNPs o los iones Ag^+ pueden generar ROS (*especies reactivas de oxígeno*) dando lugar a daños en el ADN, desnaturalización de proteínas y apoptosis (Akter y col., 2018). También se ha observado que según su forma

y tamaño tienden a acumularse en las mitocondrias, llevando a una disfunción mitocondrial, es decir, una reducción del potencial de membrana mitocondrial (MMP), y promoviendo la formación de ROS. Finalmente esto conduce al daño de las proteínas intracelulares y los ácidos nucleicos afectando la viabilidad celular.

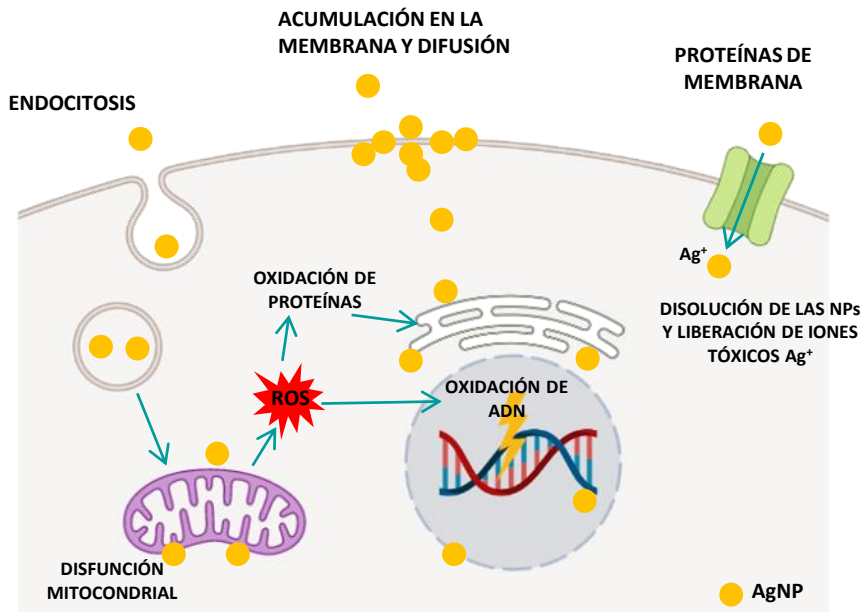


Figura 4.5: Posibles mecanismos de acción citotóxica de las AgNPs sobre las células.

Los ensayos de viabilidad son fundamentales en el área de la toxicología ya que explican la respuesta celular frente a un agente potencialmente tóxico y también brindan información sobre la muerte, supervivencia celular y actividades metabólicas (Asharani y col., 2009). Si bien los efectos citotóxicos de las AgNPs dependen de las líneas celulares utilizadas, la línea Caco-2 es una de las más utilizadas como modelo para evaluar la toxicidad de los materiales nanocompuestos que estarán en contacto con alimentos.

Como se mencionó anteriormente los ensayos de citotoxicidad son de suma importancia ya que nos permiten evaluar la respuesta celular frente a un agente potencialmente tóxico que, en esta ocasión, serían las AgNPs en caso de que hubiera migración desde los materiales desarrollados. Además, resulta interesante evaluar el efecto de la forma de obtención de las nanopartículas o de las condiciones de síntesis ya que éstas

condicionan la morfología y características de las AgNPs obtenidas como se demostró en los Capítulos anteriores.

En el Capítulo 3, Sección 4.3 se discutió el efecto citotóxico de las películas nanocompuestas con incorporación de AgNP F sobre las líneas celulares Vero y Caco-2, y en esta ocasión se comparó dicho efecto con el de las películas nanocompuestas obtenidas en los Capítulos 1 y 2. También se mencionó la clasificación de citotoxicidad en base al porcentaje de viabilidad establecido por la norma *ISO 10993* (Young, Phungtamdet, y Sanderson, 2005) el cual establece que:

- con 100-75% de viabilidad celular el material no es citotóxico
- con 74-50% resulta ligeramente citotóxico
- con 49-25% de viabilidad es moderadamente citotóxico
- y con menos del 24% de viabilidad celular es extremadamente citotóxico

La Figura 4.6 muestra la variación de la actividad mitocondrial de las células Vero y Caco-2/TC7 expuestas a las películas control (Cont y Cont L) y nanocompuestas (AgNP F, AgNP L y AgNP in situ) durante 24 h, mientras que las células incubadas sin películas (DMEM) corresponden al blanco de las células (control positivo de viabilidad). Previamente (Capítulo 3 Sección 4.3) se discutió que, para las células Caco-2 se puede observar que la citotoxicidad de los materiales nanocompuestos es menor en comparación con la línea celular de fibroblastos (Vero). Ahora, al comparar estas muestras con el resto de las películas nanocompuestas y sus respectivos controles para la misma línea celular, se evidencia que el efecto citotóxico es significativamente ($p < 0,05$) mayor para las películas conteniendo AgNP F. Palem y col., (2018), plantean que además de los factores que influyen como, el tamaño, la forma, el grado de aglomeración, la composición química de la superficie, la carga, la concentración, y el tiempo de exposición, el potencial Z también podría ser crucial en la toxicidad de las AgNPs, ya que, un aumento en el potencial Z absoluto, suele conducir a una mayor absorción de nanopartículas en comparación con otras menos cargadas, inclusive del mismo tamaño. Por otro lado, en relación al tamaño, las AgNPs más pequeñas (entre 5 y 28 nm) podrían ser más tóxicas al producir mayores cantidades de superóxido en la membrana mitocondrial (Zhang y col., 2014). Consideraciones similares en relación al

efecto del tamaño, forma y características superficiales en la citotoxicidad de las nanopartículas fueron señalados por varios autores (Rolim y col., 2019; Yu y col., 2019). Así, observando los datos presentados en la Figura 4.6, se puede considerar que el mayor efecto citotóxico de las películas conteniendo AgNP F, en comparación con el resto de los nanomateriales, es una combinación del menor tamaño de las nanopartículas obtenidas por ablación láser y su potencial zeta (6 nm y - 21,8 mV). Las películas conteniendo AgNP sintetizadas *in situ* (143 ppm) fueron las menos citotóxicas para la línea celular Caco-2 (viabilidad 90%). Para las células Vero se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control de células sin tratar (DMEM) y con las películas, ya sea, tanto para el control como para las nanocompuestas. Probablemente la formulación de la matriz (almidón + glicerol) afecta la adhesión de las células Vero lo que dificulta elucidar la acción de las AgNPs *per se*. Este efecto no se observó para las células Caco-2, lo cual es compatible con la diferencia en las respuestas de los distintos modelos celulares discutidos previamente (Capítulo 3, Sección 4.3). Lo observado sobre las células epiteliales del intestino humano puede deberse a que, al estar sintetizadas *in situ* en la suspensión filmogénica y recubiertas por el propio almidón de la matriz, permite que las AgNPs estén más integradas en la matriz polimérica, menos expuestas y por tanto se limite su interacción con las células. Yu y col. (2019), estudiaron los efectos de diferentes concentraciones (50-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de AgNPs y de nanofibras de celulosa (CNF/AgNP) sobre la viabilidad de células Caco-2 y de acuerdo con el ensayo de MTT, no observaron una disminución significativa en el número de células viables hasta que la concentración agregada fue de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos autores también mencionan que las NPs metálicas con cargas negativas pueden causar menos daño mitocondrial y alteración de la integridad de la membrana de las células de mamíferos que las NPs con cargas positivas. Los datos de potencial Z correspondientes a las películas nanocompuestas obtenidas para este trabajo de Tesis se encuentran adjuntos en la Figura 4.6. Teniendo en cuenta estos resultados se puede considerar que las películas con AgNP *in situ* no mostraron un efecto tóxico sobre las células del colon humano en 24h.

Por otra parte, al analizar el efecto citotóxico de las películas AgNP L (71,5 ppm) se encontró que no había diferencias significativas entre las muestras nanocompuestas y

su respectivo control para ambas líneas celulares. Si bien hay una disminución en la viabilidad celular, esta es superior al 60% tanto para Cont L como para las muestras con AgNP L. Una posible explicación a este resultado puede estar relacionado con la acidez aportada al medio celular por parte de las películas, ya que la suspensión filmogénica inicial presentaba un pH promedio de 3,0 y al poner en contacto el material con el DMEM (inicialmente rosa/rojo) este se tornó amarillo/naranja durante unos segundos y luego se homogeneizó reportando valores normales durante todo el ensayo. En un trabajo realizado por Rolim y col. (2019), sobre caracterización, citotoxicidad y actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de té verde mencionaron que, el uso de polifenoles del té para sintetizar AgNPs son responsables además, del *capping* de las nanopartículas obtenidas y estos fitoquímicos actúan como agentes antioxidantes y anti-inflamatorios, reduciendo así la toxicidad de las nanopartículas. Así, si bien se puede ver un efecto sobre la viabilidad de las células Caco-2/TC7 y Vero, al estar las AgNP L estabilizadas con el ácido cítrico, ascórbico y otros compuestos fitoquímicos como polifenoles y flavonoides presentes en el jugo de limón, mencionados en el Capítulo 2 Sección 4.1, sería esperable un daño celular menor, o incluso que sea reversible, si las vías de señalización desencadenadas no son de necrosis.

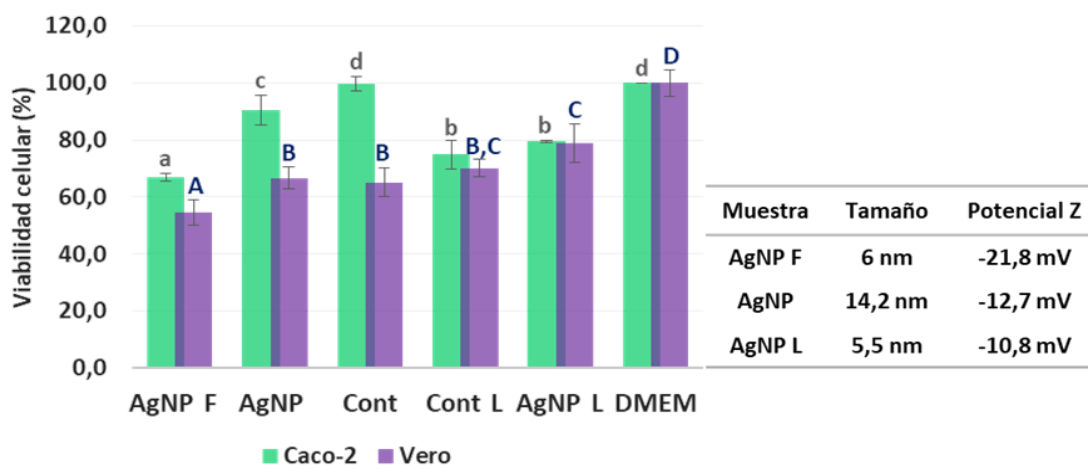


Figura 4.6: Efecto citotóxico de las películas desarrolladas en este trabajo de Tesis sobre líneas celulares Caco-2/TC7 y Vero. Se incluyen además las características relevantes de las NPs incluidas en los materiales nanocompuestos.

4.1.2. Evaluación de la viabilidad mediante tinción con yoduro de propidio

La exposición a nanopartículas y su posterior absorción afectan a varias líneas celulares incluidas las líneas fagocíticas como los macrófagos derivados de THP-1. Los macrófagos son células fagocíticas multifuncionales que pueden detectar e internalizar material endógeno y exógeno como virus, microorganismos, restos celulares y partículas extrañas incluyendo algunas variedades de NPs (Lunov y col., 2011). Debido a su disponibilidad, las líneas celulares monocíticas, con diferente grado de diferenciación como las THP-1 son un modelo *in vitro* ampliamente aceptado de macrófagos humanos. Estas líneas celulares diferenciadas presentan marcadores de superficie que pueden absorber bacterias o partículas por fagocitosis de manera eficiente en comparación con las células sin diferenciar (Lunov y col., 2011). Es decir que, las células THP-1 monocíticas exhiben una capacidad fagocítica reducida en comparación con los macrófagos.

El porcentaje de células muertas marcadas con yoduro de propidio (% de células IP+) para cada tipo de película desarrollada en este trabajo de Tesis se puede observar en la Figura 4.7. En las condiciones evaluadas, independientemente del tamaño de las nanopartículas, grado de aglomeración (vinculado al potencial Z ya que cuanto menor es el valor de éste las nanopartículas no cuentan con la fuerza suficiente como para repelerse entre sí y tienden a aglomerarse) y concentración (AgNP F y AgNP *in situ* de 143 ppm y AgNP L 71,5 ppm), no se observan diferencias significativas en las células THP-1 monocíticas necróticas (Figura 4.7a). Por un lado, esta línea celular está preparada para eliminar partículas o bacterias exógenas, y así defenderse de ataques externos y además el ensayo fue realizado con 24 h de incubación, manteniendo el contenido de suero fetal bovino, el cual puede interferir en el accionar de las nanopartículas. Se ha demostrado que pueden existir diferencias en la captación de nanopartículas en presencia y ausencia de suero fetal bovino; sin embargo Kettler, Giannakou, de Jong, Hendriks, y Krystek (2016) han sugerido que la presencia de suero es necesaria para mantener la viabilidad celular.

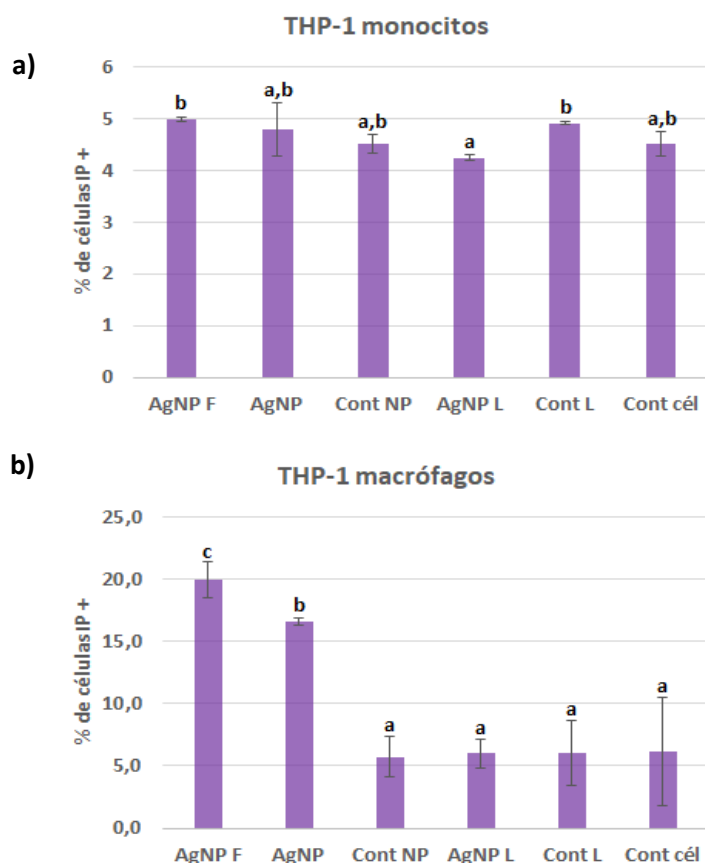


Figura 4.7: Evaluación del efecto citotóxicos sobre la línea celular THP-1 sin diferenciada (a) y diferenciada a macrófagos (b). Se informa el % de células con tinción positiva al yoduro de propidio determinado a través de citometría de flujo.

En la Figura 4.7b se puede ver que las muestras conteniendo AgNP F y AgNP *in situ* ejercen un efecto citotóxico significativo sobre las células THP-1 diferenciadas a macrófagos, que no se evidencia en las películas con AgNP L. La principal causa de este comportamiento puede estar relacionada con la menor concentración de nanopartículas incluidas en la muestra con AgNP L (71,5 ppm), en relación al resto de las películas nanocompuestas. Si bien no hay grandes diferencias, en relación al tamaño, entre las AgNP L y las AgNP F, como se indicó en la Tabla inserta en la Figura 4.6, el hecho de que las primeras estén recubiertas por componentes fitoquímicos del limón con probada acción anti-inflamatoria podría explicar que las mismas presenten efecto citotóxico sobre macrófagos.

La diferencia observada entre monocitos y macrófagos puede estar asociada a la expresión de diferentes marcadores (Assad y col., 2021). Hay bibliografía que reporta que, para los macrófagos, en presencia de suero, el receptor CD64 participa en la captación de partículas externas mediante fagocitosis (Lunov y col., 2011). Es así que, la respuesta frente a estímulos exógenos es diferente, ya sea frente a células THP-1 diferenciadas como sin diferenciar, y particularmente cuando se estudian determinados marcadores (Assad y col., 2021); si bien estos estudios exceden los alcances del presente trabajo de Tesis.

4.1.3. Análisis por componentes principales del efecto de la técnica de obtención de las AgNPs en la citotoxicidad de los materiales nanocompuestos

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) incluyendo las características de las partículas obtenidas por técnicas de síntesis química (AgNP *in situ* y AgNP L) y física (AGNP F) y la viabilidad de las células Caco-2, Vero y el % de células THP-1 (monocitos y macrófagos) positivas al IP. Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico bidimensional correspondiente (Figura 4.8). El 84,2% de la varianza total se pudo explicar a través de dos componentes principales, la primera (CP1, que explicó el 58,5%) discriminó entre los controles y los materiales nanocompuestos y la segunda (CP2, que describió el 25,7% de la varianza total) se asoció a la técnica de obtención de las nanopartículas, diferenciando entre las síntesis químicas verdes y el método físico.

La CP1 se correlaciona linealmente con las necrosis o apoptosis de las células THP-1 diferenciadas a macrófagos, con el potencial Z de las nanopartículas obtenidas y con las relaciones de absorbancia de los picos de FTIR (relacionados con la proporción de fase amorfa-cristalina de las películas desarrolladas). Por su parte la CP2 se correlacionó en forma directa con el % de células THP-1 monocíticas positivas al IP. Ambas componentes permitieron explicar los diámetros de partículas de las AgNPs (CP1=-0,62 y CP2=-0,59) y la viabilidad tanto de las células Caco-2 (CP1=0,60 y CP2=-0,51) como de las Vero (CP1=0,76 y CP2=-0,55). La correlación cofenética fue de 0,926 indicando que la agrupación de variables realizada fue satisfactoria.

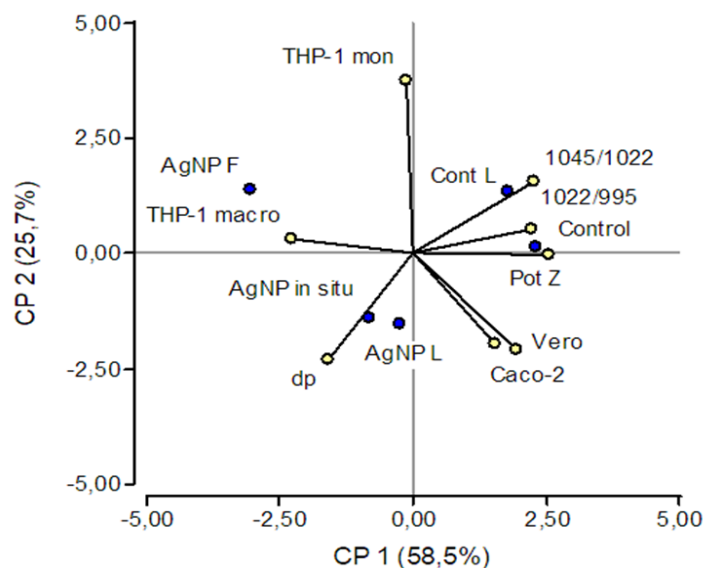


Figura 4.8: Gráfico Biplot resultante del análisis por componentes principales (ACP) de la viabilidad de las tres líneas celulares ensayadas y las características de los materiales nanocompuestos (puntos amarillos) conteniendo AgNPs obtenidas por técnicas de síntesis química (AgNP *in situ* y AgNP L) y física (AGNP F), (puntos azules). Las propiedades analizadas fueron: la viabilidad de las células Caco-2, Vero y el % de células THP-1 (monocitos y macrófagos) positivas al IP, las relaciones de los picos de FTIR 1022/995 y 1045/1022, y características de las nanopartículas como el diámetro medio (dp) y el potencial Z de las suspensiones que las contienen.

4.2. Estudio de la migración de las nanopartículas de plata hacia simulantes alimentarios

Uno de los pasos más importantes durante el desarrollo de nuevos materiales destinados al envasado de alimentos es el estudio de la posible migración de compuestos presentes en el material hacia el producto que contiene. La migración de un determinado compuesto, en el caso del presente trabajo de Tesis de las nanopartículas de Ag, puede estar fuertemente influenciada por la interacción entre este compuesto y la matriz polimérica, así como por las posibles interacciones del migrante con el alimento (o simulante alimentario) con el que está en contacto. Para poder estudiar la cinética de liberación de estos compuestos y evaluar los mecanismos que prevalecen se han desarrollado varios modelos matemáticos que describen los procesos involucrados (Boostani y Jafari, 2021). Generalmente se sugiere que la

migración de los compuestos (de naturaleza iónica, molecular o nanopartículas en este caso) puede deberse principalmente a procesos de difusión, hinchamiento y relajación de las cadenas poliméricas del material (Agustinelli, Ciannamea, Ruseckaite, y Martucci, 2021; Boostani y Jafari, 2021; Papadopoulou, Kosmidis, Vlachou, y Macheras, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la migración es el resultado de varios procesos que involucran la transferencia de masa de compuestos de bajo peso molecular, que se encuentran inicialmente en el envase, hacia una muestra de alimento o simulante alimentario (Han y Floros, 1997; López-de-Dicastillo y col., 2012; Agustinelli y col., 2021).

La difusión de una sustancia en un polímero generalmente obedece a la segunda ley de Fick (Crank, 1979) (Ec. 4.2)

$$\frac{\partial C_A^P}{\partial t} = D_A^P \frac{\partial^2 C_A^P}{\partial x^2} \quad [4.2]$$

donde C_A representa la concentración migratoria local de A, t es el tiempo, x es la dirección lineal del transporte de masa y D_A es el coeficiente de difusión de la sustancia A. Considerando las condiciones de contorno y la geometría del material (una placa plana de espesor δ) la solución puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} e \left[-\frac{(2n+1)^2}{\delta^2} Dt \right] \quad [4.3]$$

siendo M_t (ppm) la cantidad total de la sustancia que difunde a tiempo t (s), M_∞ (ppm) la cantidad correspondiente a tiempo infinito, δ el espesor del film (cm) y D , el coeficiente de difusión (cm^2/s). Se ha propuesto que en la ecuación 4.3 se considere un coeficiente de difusión aparente (D_{ap}) dado que los films de naturaleza hidrofílica como los de almidón se hinchan en contacto con solventes acuosos. En este trabajo de Tesis se asume esta condición, si bien no se ha realizado un cambio de nomenclatura.

Simplificando la expresión para tiempos cortos y considerando la solución de la ecuación [4.3] para un medio semi-infinito:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{Dt}{\pi\delta^2}} \quad [4.4]$$

Esta expresión (Ec. 4.4) indica que la difusión Fickeana en una película delgada está caracterizada por una dependencia inicial del transporte del compuesto que varía con el $t^{1/2}$. La aproximación de tiempos cortos es válida hasta la liberación del 60 % del total del componente capaz de difundir.

Las ecuaciones 4.3 y 4.4 cumplen con ciertas condiciones: i) se considera que las películas tienen un espesor constante e infinito en contacto con el solvente, ii) en todo momento el componente que migra se encuentra distribuido homogéneamente en la película, iii) se desprecia el hinchamiento del material, iv) el coeficiente de difusión no varía con el tiempo, v) no se produce evaporación o transformación química del migrante durante el proceso (Poças y Franz, 2018). Particularmente, la Ec. 4.4 asume una variación lineal de la concentración del agente activo con la raíz cuadrada del tiempo, donde la pendiente da información sobre el coeficiente de difusión aparente del compuesto que migra, según la Ec. 4.3.

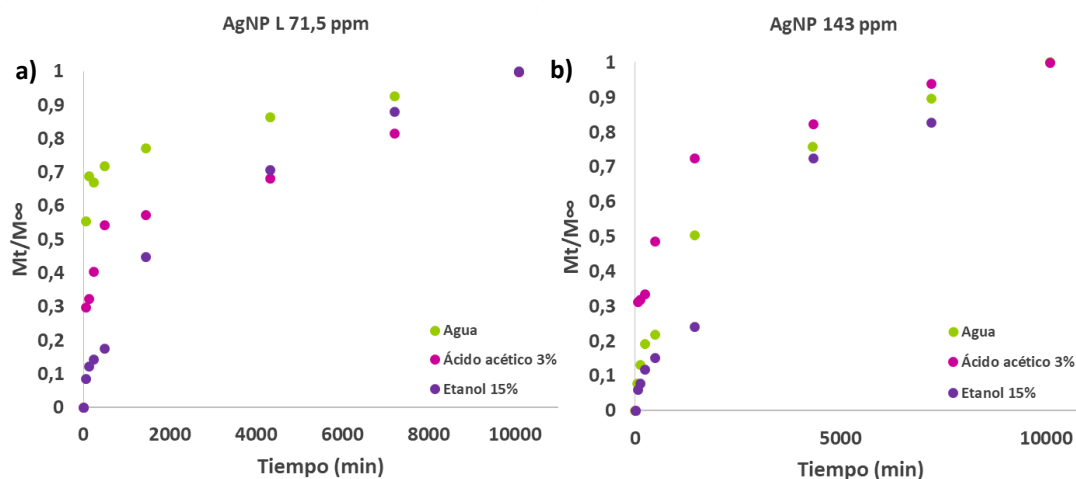


Figura 4.9: Perfiles normalizados de la liberación de plata para las películas con incorporación de AgNP L 71,5 ppm (a) y con 143 ppm de AgNPs sintetizadas *in situ* (b), para los tres simulantes de alimentos ensayados.

En la Figura 4.9 se presentan los perfiles de liberación de plata de las películas nanocompuestas en los simulantes de alimentos ensayados. Las curvas fueron

normalizadas respecto a la concentración de equilibrio de Ag en cada simulante (M_{∞}). Las películas de almidón con 71,5 ppm de AgNP L (Figura 4.9a) mostraron una tasa de liberación más alta a tiempos cortos (entre 0 y 8 h) en comparación con las muestras que contienen AgNPs sintetizadas *in situ*. Sin embargo, las condiciones estandarizadas en los ensayos de migración con medios simulantes no representan la realidad (de hecho sobreestiman la migración de las nanopartículas) ya que, cuando se utilizan películas como envases de alimentos sólo una cara del material está en contacto con el producto envasado, por lo que la difusión ocurre solamente desde esta cara del material, siendo la liberación cuatro veces más lenta que cuando ocurre hacia ambos lados (Bierzhal y col., 2012).

En la Figura 4.9b, las curvas correspondientes a la liberación de Ag en las muestras con AgNPs *in situ*, presentan una forma de doble sigmoide a tiempos cortos, poniendo en evidencia que el mecanismo de liberación no correspondería a un proceso netamente Fickiano seguido por una segunda etapa, también de forma sigmoidea que evidencia la presencia de otro mecanismo. Un comportamiento similar presentan las películas de almidón conteniendo AgNP L en el simulante de etanol 15%. Algunos autores atribuyen la segunda sigmoidea de las curvas de liberación a la existencia de fenómenos de relajación lentos de la matriz polimérica, inducidos por el hinchamiento. Estos procesos de relajación están relacionados con los tiempos finitos que necesitan las cadenas macromoleculares para responder a la presión de hinchamiento osmótico y ordenarse para alojar las moléculas de solvente que penetran en el interior de la matriz (Lee 1985, Peppas y Franson 1983). Boostani y Jafari (2021) recopilaron la información relacionada a los procesos de migración/liberación controlada de compuestos activos desde matrices biopoliméricas. Los autores indican que en sistemas como los desarrollados en el presente trabajo de Tesis se puede presentar una migración trifásica con una fase II corta. En este tipo de sistemas, la fase I se define como un efecto de explosión o ráfaga, el cual se asocia con los compuestos que se encuentren en la superficie del portador y por lo tanto, están fácilmente disponibles para la hidratación y posterior liberación. La formación de grietas y la descomposición de partículas pueden ser las otras razones de la liberación por explosión. A continuación en la fase II los activos pueden difundir lentamente a través del polímero (el cual puede volverse más denso por efecto del

hinchamiento) o a través de los poros disponibles, mientras continúa la descomposición del polímero. Por último, la fase III (también denominada como segunda ráfaga) suele ser un período de liberación más rápido normalmente asociado con el inicio de la erosión, aunque también puede ser causado por agrietamiento o ruptura estructural. El inicio rápido de la liberación puede estar relacionado con un extenso hinchamiento, erosión y deformación de los materiales dando como resultado una mayor tasa de liberación debido a la mayor accesibilidad de la superficie. Se puede establecer que la liberación de la fase III está relacionada con la formación de poros, derivados de los mecanismos de degradación y erosión (Fredenberg y col., 2011, Boostani y Jafari, 2021).

Tabla 4.2: Parámetros correspondientes al modelo difusivo aplicado a la migración de Ag desde las películas nanocompuestas.

Muestra	Simulante	D_1 (cm^2/s)	R^2	D_2 (cm^2/s)	R^2
AgNP L 71,5ppm	Agua	$5,61 \cdot 10^{-10}$	0,91	$1,33 \cdot 10^{-7}$	0,96
	Ácido acético 3%	$1,53 \cdot 10^{-9}$	0,92	$1,02 \cdot 10^{-9}$	0,65
	Etanol 15%	$3,72 \cdot 10^{-9}$	0,98	$1,77 \cdot 10^{-9}$	0,82
AgNP <i>in situ</i> 143ppm	Agua	$3,41 \cdot 10^{-9}$	0,98	$1,84 \cdot 10^{-9}$	0,73
	Ácido acético 3%	$1,99 \cdot 10^{-9}$	0,98	$1,14 \cdot 10^{-9}$	0,52
	Etanol 15%	$3,68 \cdot 10^{-9}$	0,98	$3,57 \cdot 10^{-10}$	0,74

D₁: corresponde al coeficiente de difusión de los datos ajustados con la Ecuación 4.3

D₂: corresponde al coeficiente de difusión de los datos ajustados con la Ecuación 4.4 a tiempos cortos de contacto.

El coeficiente de difusión (D) se estimó ajustando los datos experimentales con la Ecuación 4.3 y los datos a tiempos cortos de contacto ($M_t/M_\infty < 0,6$) a partir de la Ecuación 4.4. Los valores obtenidos utilizando los dos ajustes se presentan en la Tabla 4.2 y fueron similares para las muestras conteniendo AgNP L en medio ácido y alcohólico, y para las películas con AgNPs *in situ* en medio acuoso y ácido, ya que, los valores de D_1 y D_2 presentaron el mismo orden de magnitud. Según Dias y col. (2018),

este resultado indica que el 60 % de la difusión se da a tiempos cortos de contacto entre la película y el medio de inmersión y la ecuación para períodos cortos de tiempo (Ec. 4.4) puede utilizarse para describir el proceso de difusión. Sin embargo, el coeficiente de correlación (R^2) obtenido para el ajuste de los datos a tiempos cortos es bajo por lo que no representan correctamente a los datos experimentales obtenidos, principalmente para el simulante ácido acético 3% donde los R^2 fueron de 0,65 y 0,52 para las muestras de AgNP L y AgNP *in situ*, respectivamente. Para las muestras con AgNP L, si bien el R^2 tiene un valor aceptable para tiempos cortos de contacto en el medio hidrofílico, el D se obtuvo por ajuste de escasos puntos.

La posible aparición de otros mecanismos en el proceso de migración (Figura 4.9) podría ser responsable de esta diferencia entre los datos experimentales y el ajuste de las curvas dado que, los coeficientes de difusión se obtienen a partir de cálculos matemáticos suponiendo un comportamiento difusivo neto y en realidad, el mecanismo de liberación es más complejo y depende de las características de la matriz en estudio, debido a esto, la información aportada por los valores de los coeficientes de difusión (D) no es concluyente. Por otro lado, algunos autores sugieren que no se puede descartar la disolución de partículas metálicas en iones, convirtiéndose en un mecanismo de liberación importante en ciertos casos (Heydari-Majd y col., 2019).

El movimiento de los componentes activos desde materiales poliméricos se puede dar por diferentes procesos, los cuales no se tienen en cuenta en la segunda ley de Fick. Por ejemplo, en el caso de los polímeros que tienen la capacidad de hincharse en el medio en el que se encuentran inmersos; las interacciones entre las cadenas poliméricas disminuyen a expensas de las interacciones de éstas con las moléculas del solvente. Cuando la separación entre las cadenas del polímero es suficiente, se induce una transición vítrea en el material y una relajación de las cadenas. Consecuentemente se produce un aumento del volumen libre y disminuye la densidad del material, así el medio líquido que penetra puede arrastrar a las partículas del componente activo. Es por ello que otros autores han desarrollado modelos empíricos a partir de los cuales se puede distinguir un mecanismo de liberación por difusión, es decir que responde a la ley de Fick, de un comportamiento anómalo o no Fickiano (cuando el mecanismo de liberación es complejo, ya sea porque no se conoce o porque ocurre por más de un

mecanismo). En este sentido, Ritger y Peppas (1987) desarrollaron un modelo semi-empírico sencillo que relaciona la liberación del compuesto activo con el tiempo de contacto a través de una ecuación exponencial:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad [4.5]$$

donde, k es una constante cinética asociada a la velocidad a la que ocurre el proceso, y n , es el exponente difusional indicativo del mecanismo de transporte. Este modelo es conocido como Ley de la potencia y, se considera válido siempre y cuando el principio activo liberado sea inferior al 60 %, es decir que M_t/M_∞ debe ser $< 0,6$. En esta condición la ley de la potencia se aproxima a la ley de Fick si el proceso es puramente difusional. Según los valores que tome n , se pueden definir distintos mecanismos de transporte o liberación (Peppas, 1985). Valores de $n > 0,5$ se asocian a un mecanismo de difusión anómalo (no Fickiano). En particular, cuando $n = 1$, se trata de una cinética de orden cero. Estudios realizados por Peppas (1985) indican que este es un caso límite donde el transporte del soluto se realiza a velocidad constante debido a que el frente de hinchamiento del polímero avanza de forma constante, siendo controlado por la relajación de las cadenas poliméricas. El agua que penetra en el sistema actúa como plastificante disminuyendo la T_g del polímero y aumentando la movilidad de las cadenas poliméricas debido a una disminución en las interacciones como se describió anteriormente. Cuando $0,5 < n < 1$ el proceso está dominado por mecanismos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas, mientras que valores de $n > 1$ aparecen usualmente cuando los tiempos de liberación son muy elevados. Por último, si $n < 0,5$ el mecanismo se asocia a la presencia de poros en la matriz polimérica.

La Tabla 4.3 presenta los valores del exponente de difusión (n) y de la constante cinética asociada a la velocidad (k), así como también el cuadrado medio del error (CMError) para los casos analizados. A la inversa de lo que ocurre con el R^2 , cuando el CMError se hace más pequeño significa que la bondad de ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto es mayor (Di Rienzo y col., 2020). Para las muestras conteniendo AgNP L, tanto en medio acuoso como ácido, el $n \leq 0,5$ lo cual sugiere que el mecanismo de liberación de las nanopartículas de plata fue mediado principalmente por difusión

Fickeana, mientras que en el medio con etanol al 15% el valor de $n = 0,61$ indica que la liberación del agente activo se da por un mecanismo de “difusión anómalo”, ya que se encuentra en el rango de $0,5 < n < 1$, en donde el proceso de difusión es una combinación de la difusión Fickeana y no Fickeana (probablemente tiene lugar un fenómeno de relajación de las cadenas poliméricas que como ya se mencionó acompaña al proceso difusivo).

Para las muestras de AgNP *in situ* en medio acuoso se plantea un análisis similar al anterior ya que, el parámetro n arrojó un valor de 0,59, mientras que la liberación de nanopartículas de plata en el medio ácido y alcohólico se dio mediante un mecanismo netamente difusivo debido a que el valor de n fue de 0,23 y 0,43, respectivamente.

En medio acuoso el parámetro k fue más alto para las muestras de AgNP L, sugiriendo que la liberación de Ag fue más rápida que para las muestras con AgNP *in situ* a tiempos cortos, en tanto que para el medio ácido y con etanol al 15% no se observaron diferencias. En base a los bajos valores de CMError obtenidos, los perfiles de liberación para las películas de almidón con AgNP L en agua y con AgNP *in situ* en agua y etanol podrían ajustarse satisfactoriamente con el modelo de Ritger y Peppas.

Si bien los cálculos indican que el mecanismo de liberación de Ag es difusivo para las muestras conteniendo AgNP *in situ*, en medio acético y etanólico - ajustados a tiempos cortos los datos experimentales por la ley de la potencia- al observar la Figura 4.9b se puede ver claramente que la curva presenta una sección de doble sigmoidea a esos tiempos, por lo cual no se puede descartar la presencia de un mecanismo complejo de migración que involucre tanto el hinchamiento como la relajación de las cadenas.

Tabla 4.3: Parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de liberación de Ag según el modelo de Ritger y Peppas.

Muestra	Simulante	n	k	CMError
AgNP L 71,5ppm	Agua	0,20	0,55	$8,5 \cdot 10^{-6}$
	Ácido acético 3%	0,21	0,30	$1,9 \cdot 10^{-3}$
	Etanol 15%	0,61	0,06	$1,4 \cdot 10^{-3}$
AgNP in situ 143ppm	Agua	0,59	0,08	$5,5 \cdot 10^{-4}$
	Ácido acético 3%	0,23	0,28	$1,4 \cdot 10^{-3}$
	Etanol 15%	0,43	0,06	$3,8 \cdot 10^{-5}$

Otra alternativa para describir los mecanismos de liberación es mediante la ecuación de Weibull (Ec.4.4), la cual a diferencia de los otros modelos, se trata de un modelo empírico.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b) \quad [4.6]$$

con a y b , constantes. El parámetro a define la escala temporal del proceso mientras que el parámetro b define la forma de la curva: $b=1$ corresponde a una función exponencial; $b>1$ define una curva sigmoidea con un punto de inflexión; y $b<1$ describe una función que se asemeja a una parábola en tiempos cortos seguida de una exponencial para el resto de la curva (D'Souza, Faraj, y DeLuca, 2005). Este parámetro también hace referencia al mecanismo de liberación involucrado, según lo publicado por Papadopoulou y col., (2006) valores de b entre 0,35 - 0,75 corresponden a liberación por difusión, mientras que si se encuentran en el rango de 0,75 a 1 el mecanismo de liberación será una combinación de hinchamiento y relajación de las cadenas poliméricas. Finalmente si $b>1$ se estima que un mecanismo complejo gobierna la liberación del componente activo desde el material al medio simulante.

Tabla 4.4: Parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de liberación de Ag según el modelo de Weibull.

Muestra	Simulante	a	b	CMError
AgNP L 71,5ppm	Agua	0,84	0,22	$2,2 \cdot 10^{-3}$
	Ácido acético 3%	0,32	0,36	0,01
	Etanol 15%	0,05	0,79	$2,1 \cdot 10^{-3}$
AgNP <i>in situ</i> 143ppm	Agua	0,06	0,74	$1,2 \cdot 10^{-3}$
	Ácido acético 3%	0,27	0,47	$2,4 \cdot 10^{-3}$
	Etanol 15%	0,02	1,02	$2,8 \cdot 10^{-3}$

Al aplicar el modelo de Weibull para estudiar el proceso de migración de plata, la muestra de AgNP L en medio acuoso no pudo ser ajustada ya que el valor de b fue menor a 0,35 ($b = 0,22$). Con respecto al medio con ácido acético al 3 %, el modelo predijo que el mecanismo de liberación era difusivo, lo cual coincide con lo encontrado mediante el modelo de Ritger y Peppas. Para el simulante con etanol al 15 %, el ajuste por el modelo de Weibull reveló un mecanismo de hinchamiento y relajación de las cadenas poliméricas, el cual se puede acercar a lo observado aplicando la Ec. 4.4 para tiempos cortos de contacto y por la ley de la potencia.

Al evaluar los materiales con AgNP *in situ* en medio acuoso el valor de $b = 0,74$ indicaría un mecanismo difusivo de liberación, pero no se puede descartar que haya cierta contribución del hinchamiento y relajación de las cadenas ya que este comportamiento aparecería para b entre 0,75 y 1 y, aplicando el modelo de Ritger y Peppas se predijo un mecanismo anómalo de liberación. En medio ácido el resultado ($b = 0,47$) coincide con el modelo anterior (ley de la potencia) y la migración de Ag se daría netamente por difusión. Para finalizar, las muestras sumergidas en etanol presentaron un mecanismo de liberación complejo ($b > 1$); si bien no coincide con lo propuesto por los modelos anteriores, debe tenerse en cuenta la forma de doble sigmoide presente en el perfil de liberación (Figura 4.9).

En la Figura 4.10 se muestran los datos de la liberación normalizados junto al ajuste del modelo de la Ley de la potencia (Ritger y Peppas) y de Weibull.

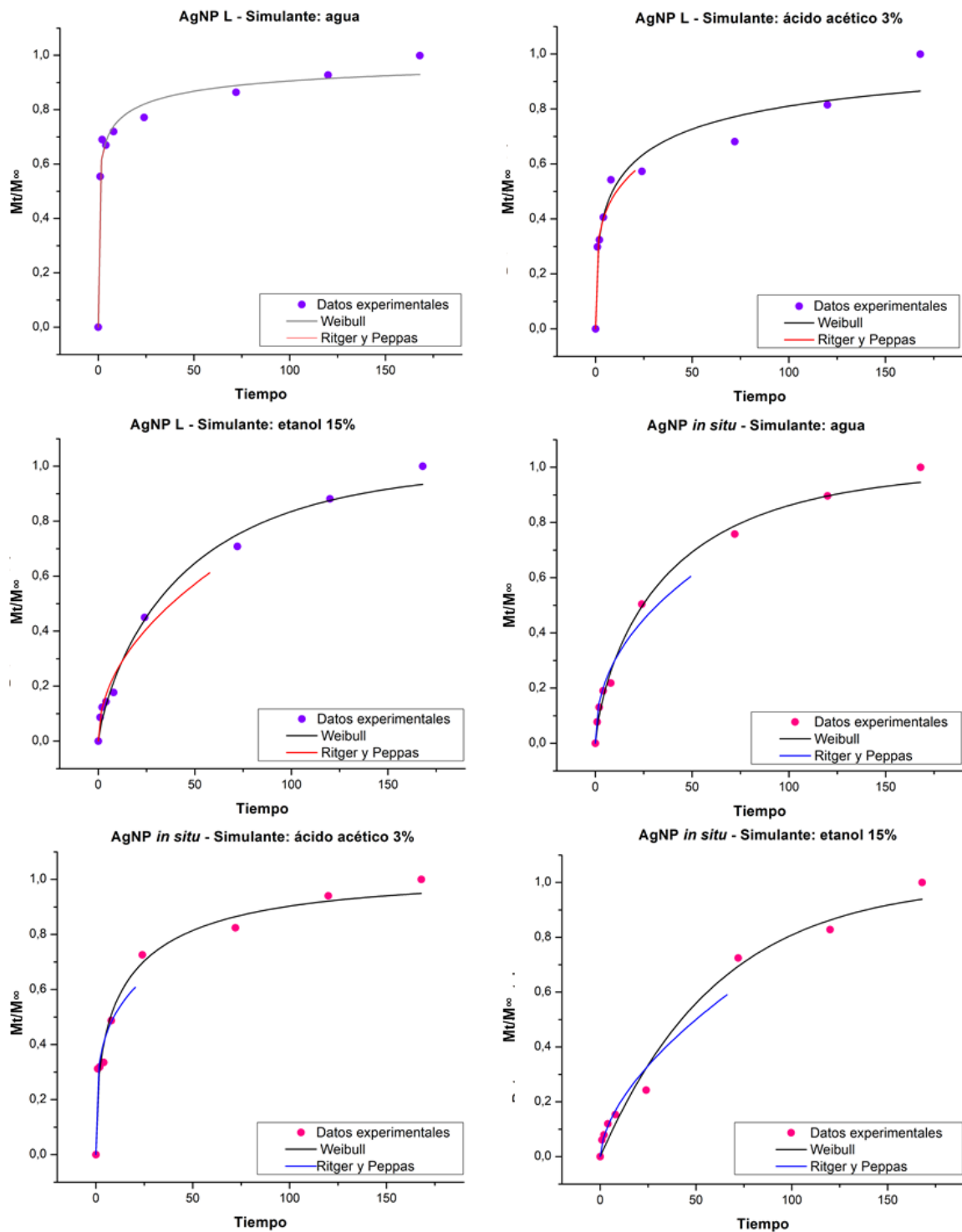


Figura 4.10: Perfiles de migración de plata normalizada para las películas conteniendo AgNP L y AgNP *in situ* junto al ajuste obtenido por los modelos de Ritger y Peppas y de Weibull para los diferentes simulantes ensayados.

El conocimiento del proceso de liberación de los agentes activos desde la matriz de la película hacia los alimentos, es un factor determinante en el desarrollo de envases antimicrobianos y la mayoría de estos estudios se realizan utilizando sistemas de simulación, sin tener en cuenta los efectos potenciales de éstos en los alimentos reales (Vilela Dias, 2019). Como ya se mencionó e independientemente del modelo de ajuste a los datos experimentales utilizado, se realiza una sobreestimación de lo sucedido ya que, algunos modelos representan la migración a través de ambas caras cuando en realidad sólo una es la que se encuentra en contacto con el producto. Por otro lado, la elevada temperatura de ensayo (35 °C) agudiza el problema de la migración dado que se genera una situación de abuso térmico, donde generalmente las altas temperaturas aceleran los procesos de difusión de los agentes activos desde la matriz polimérica hacia el medio simulante (Heydari, 2019). De todas formas, es importante señalar que las condiciones de ensayo utilizadas en el presente trabajo de Tesis corresponden a protocolos estandarizados por organismos internacionales (Reglamento de la UE n° 10/2011).

Si bien los modelos aplicados indicaron que las películas conteniendo AgNP L liberan Ag al medio más fácilmente, al analizar los gráficos del contenido de plata liberado (ppm, mg de Ag que migró por cada kg de simulante) en función del tiempo (Figura 4.11 a y b) se observa que la concentración es menor que para el caso de las películas con AgNPs sintetizadas *in situ*. Este resultado también está asociado con las diferentes concentraciones de Ag que contienen ambos materiales nanocompuestos, como era de esperar.

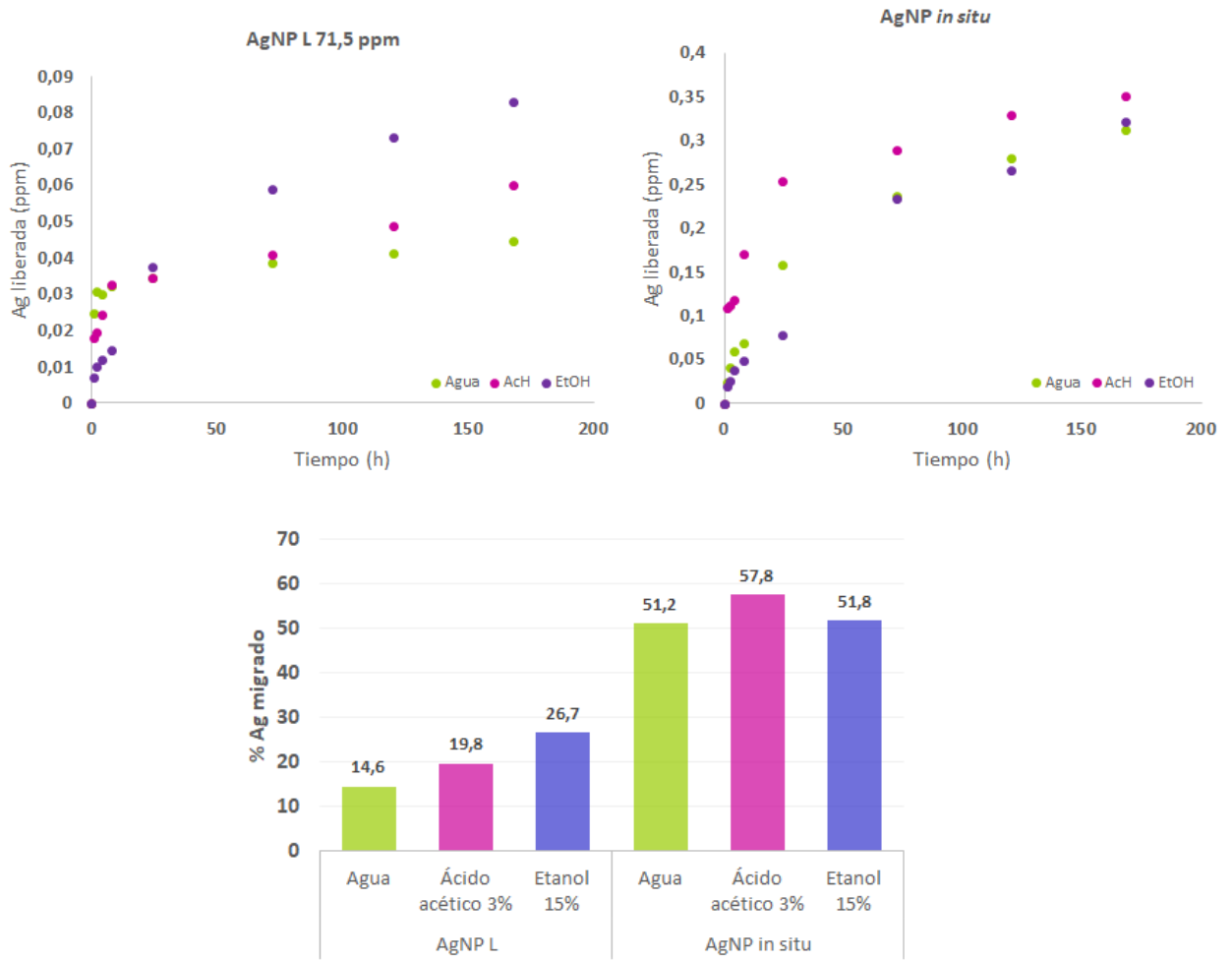


Figura 4.11: Contenido de plata liberado (ppm), en función del tiempo, a los distintos simulantes desde las películas con AgNP L (a) y AgNP in situ (b). Porcentaje de migración de Ag luego de 7 días de inmersión de las muestras en los diferentes simulantes (c).

El porcentaje de migración de Ag, respecto al contenido inicial, luego de 7 días de inmersión de las muestras en el medio simulante se calculó considerando, los mg de Ag en la muestra que se utilizó para el ensayo (película de 3,24 cm²) y los mg de Ag migrados al volumen de simulante (13 mL) a los 7 días. Este contenido fue mucho menor para las películas conteniendo 71,5 ppm de AgNP L (Figura 4.11c). Al realizar el análisis en función de los tamaños de las NP, si bien se esperaría que las AgNP *in situ* migren menos debido a su mayor tamaño (14,2 ± 4,4 nm), las AgNP L (5,5 ± 0,8 nm) probablemente presenten un mejor recubrimiento otorgado por los diferentes constituyentes del jugo de limón en comparación con las *in situ*, en donde solamente la

maltosa (agente reductor) y el almidón (*capping* y polímero constituyente de la matriz) participan en la síntesis. Además, este comportamiento también puede estar relacionado con características propias de las matrices de las películas; como se mencionó en el Capítulo 2 (Sección 4.3.3 y 4.3.4) el ácido cítrico aportado por el jugo puede estar actuando como plastificante y agente entrecruzante retardando así el proceso de disolución de la matriz, y por ende, la migración y/o disolución de las AgNPs.

Se ha estipulado un límite máximo de migración global para garantizar que los materiales no transfieran grandes cantidades de sustancias que, incluso siendo seguras, podrían provocar, en ciertos casos, cambios inaceptables en la composición de los alimentos. La legislación actual (Reglamento de la Comisión Europea, 2011) ha establecido límites generales de migración para alimentos en contacto con materiales de 10 mg/dm² o 60 mg/kg de simulante. En esta ocasión, luego de 7 días de inmersión de las películas en los simulantes seleccionados se encontró que para todos los casos el valor fue 10 veces menor a lo establecido por la norma (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Contenido de plata liberado al medio luego de 7 días de inmersión en los simulantes alimentarios seleccionados.

Muestra	Simulante	mg Ag/dm ²
AgNP L 71,5ppm	Agua	0,020 ± 0,0001
	Ácido acético 3%	0,024 ± 0,005
	Etanol 15%	0,033 ± 0,003
AgNP <i>in situ</i> 143ppm	Agua	0,128 ± 0,01
	Ácido acético 3%	0,141 ± 0,01
	Etanol 15%	0,130 ± 0,01

Según Pocas y Franz (2018), la información disponible sobre los perfiles toxicocinéticos y toxicológicos de los nanomateriales es limitada, y, la caracterización, detección y

medida de las nanopartículas en los alimentos y matrices alimentarias para evaluar la exposición están aún en desarrollo. Además, se debe considerar la posibilidad de transferencia de nanopartículas a los alimentos mediante otros procesos además de la migración, ya que las condiciones de uso reales pueden introducir nuevos factores que se desvíen de las condiciones asumidas en los modelos matemáticos utilizados.

4.3. Evaluación de la biodesintegración de las películas en suelo

Como ya se mencionó, los materiales biodegradables son aquellos capaces de ser degradados en ambientes naturales, particularmente por la actividad enzimática de microorganismos (hongos y bacterias) en presencia (degradación aeróbica) o ausencia (degradación anaeróbica) de oxígeno dando dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos, metano y biomasa (Gautam y Kaur, 2013). Para lograr la biodegradación de los polímeros, los microorganismos primero necesitan escindir las cadenas del polímero con el fin de reducir su peso molecular y hacer factible su transporte a las células, donde tienen lugar la mayoría de los procesos bioquímicos. Para descomponer los materiales poliméricos, los microorganismos excretan enzimas extracelulares. Luego, se produce el deterioro aeróbico o anaeróbico si el material es biodegradable (Souza y Fernando, 2016).

Para determinar cambios físicos en las muestras de las películas sometidas al ensayo de degradación, las mismas se retiraron periódicamente y se examinaron tanto visualmente como al microscopio óptico.

El aspecto visual de las muestras control, y de las películas de almidón nanocompuestas obtenidas con 143 ppm de AgNP *in situ* y con incorporación de 71,5 ppm de AgNP L, luego de permanecer enterradas durante un cierto tiempo se puede visualizar en la Figura 4.12 Inicialmente todas las muestras eran flexibles, incoloras y transparentes como se mencionó en los Capítulos 1 y 2. Luego de la incubación en suelo a 20 °C durante 14 días se observaron grietas en las películas con AgNP L y su correspondiente control. Además, fue posible percibir un notable cambio de color y tonalidad, lo que sugiere que comenzó el proceso de desintegración de los materiales por parte de los hongos y microorganismos presentes en la tierra (Zafar y col., 2013). Debido a que la absorción de agua de las películas facilita la digestión microbiana del almidón causando la fractura

de las muestras, recién a los 28 días de almacenamiento comenzó a ser visible la descomposición de las películas control y con AgNP *in situ*, al mismo tiempo que avanzó el proceso para el resto de los materiales. Asimismo, se pudo observar que la biodesintegración de las muestras conteniendo extractos de jugo de limón requirió menos tiempo en comparación con las muestras que no lo contienen, debido a que los compuestos orgánicos presentes en el limón serían una fuente de nutrientes más rica para los microorganismos del suelo y por ende facilitarían la degradación del material. Resultados similares fueron reportados por Luchese y col., (2021) quienes trabajaron con películas de almidón de mandioca a las que les incorporaron residuos de naranja y; unos años antes por Medina-Jaramillo y col., (2016) que agregaron extractos de yerba mate a películas de almidón de yuca.

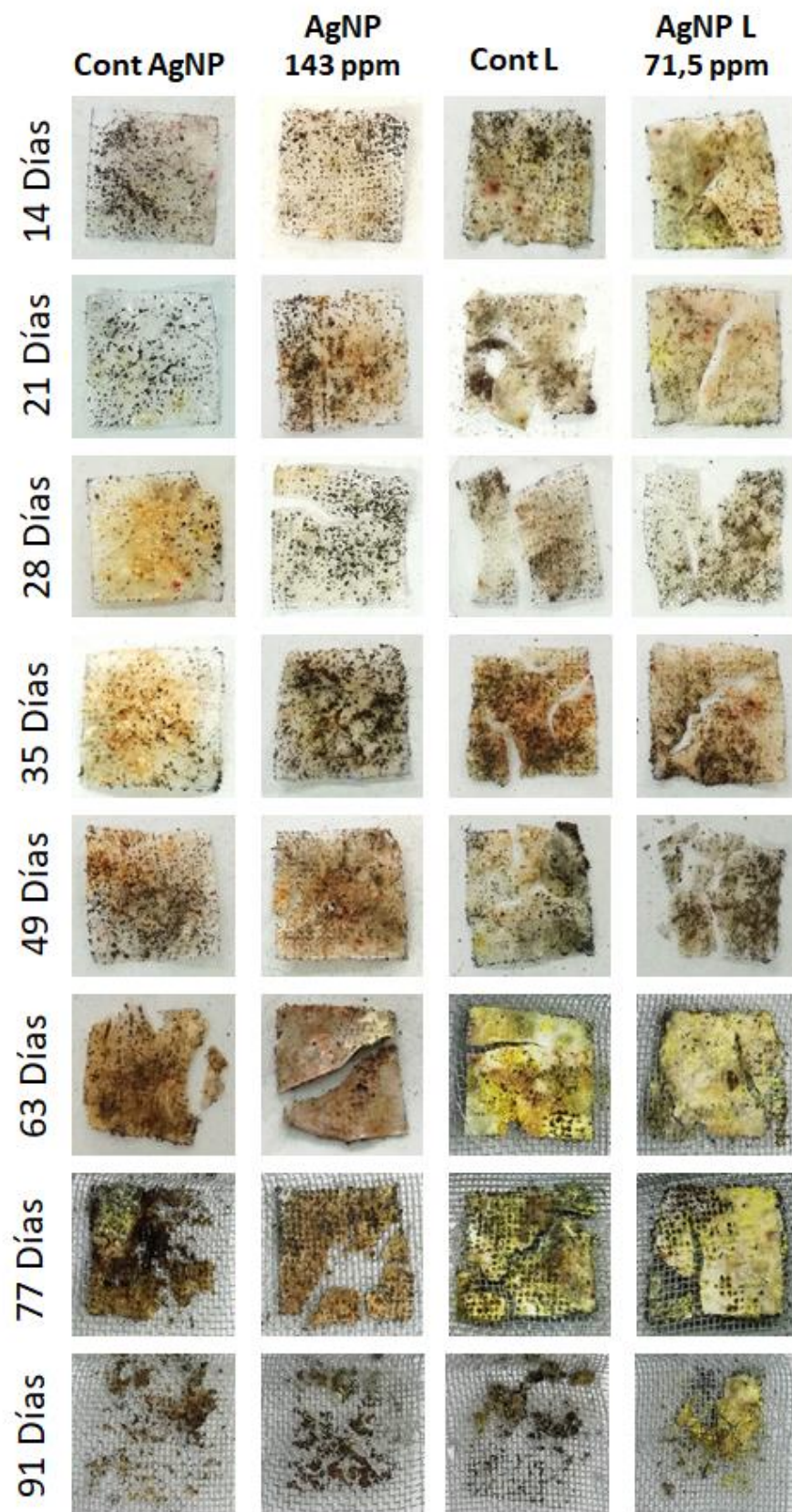


Figura 4.12: Seguimiento fotográfico del proceso de biodesintegración de las películas control y nanocompuestas con AgNP L y AgNP *in situ*.

El proceso de biodegradación es mucho más complejo que lo considerado hasta el momento. Al analizar el porcentaje de la pérdida de peso se encontró que para las muestras control, este valor se aproxima al 74 %, en promedio, a los 91 días de enterradas en compost y para el mismo período de tiempo, este resultado fue algo menor y arrojó un valor de 49,4% para las muestras con AgNP L y de 56,3 % para las películas con nanopartículas sintetizadas *in situ* (Figura 4.13).

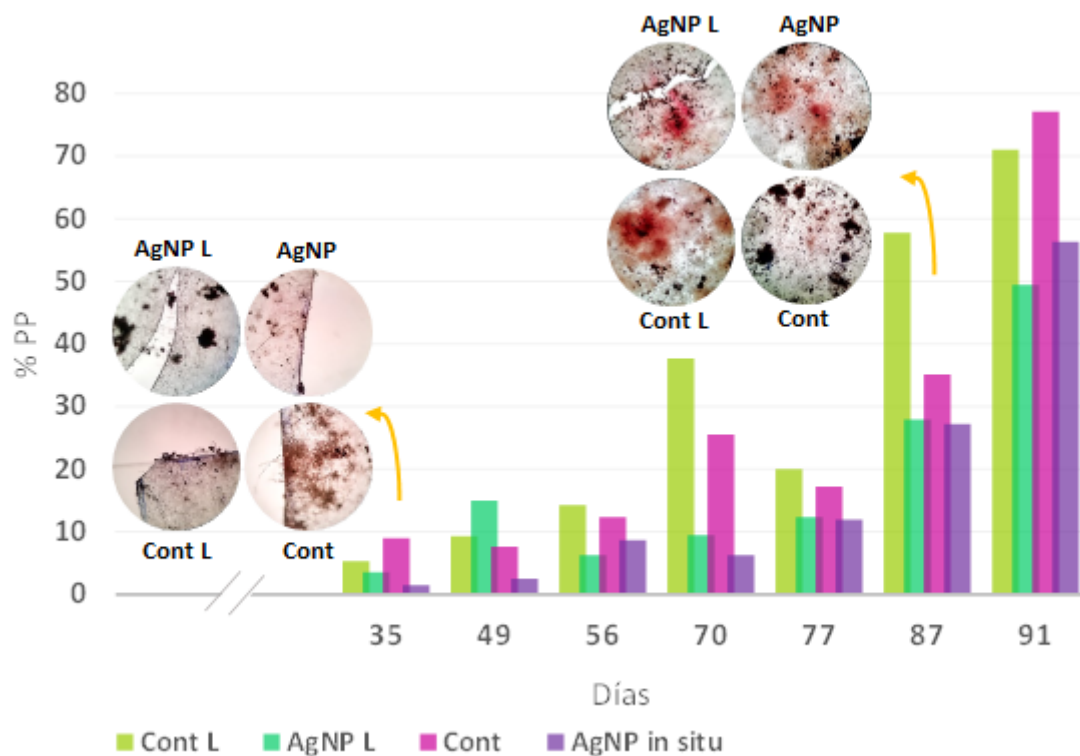


Figura 4.13: Porcentaje de pérdida de peso (%PP) de los materiales sometidos a biodesintegración.

La presencia de hifas o crecimiento micelial observados al microscopio óptico (imágenes insertas en la Figura 4.13) y por microscopía electrónica de barrido de las muestras a los 87 días de degradación (Figura 4.14), muestran una marcada colonización de las películas avalan lo mencionado anteriormente y concuerdan con lo observado en la Figura 4.12. A medida que avanza la biodegradación, disminuye el área de las películas, se fragmentan y luego se observa un colapso de la estructura hacia el final del ensayo.

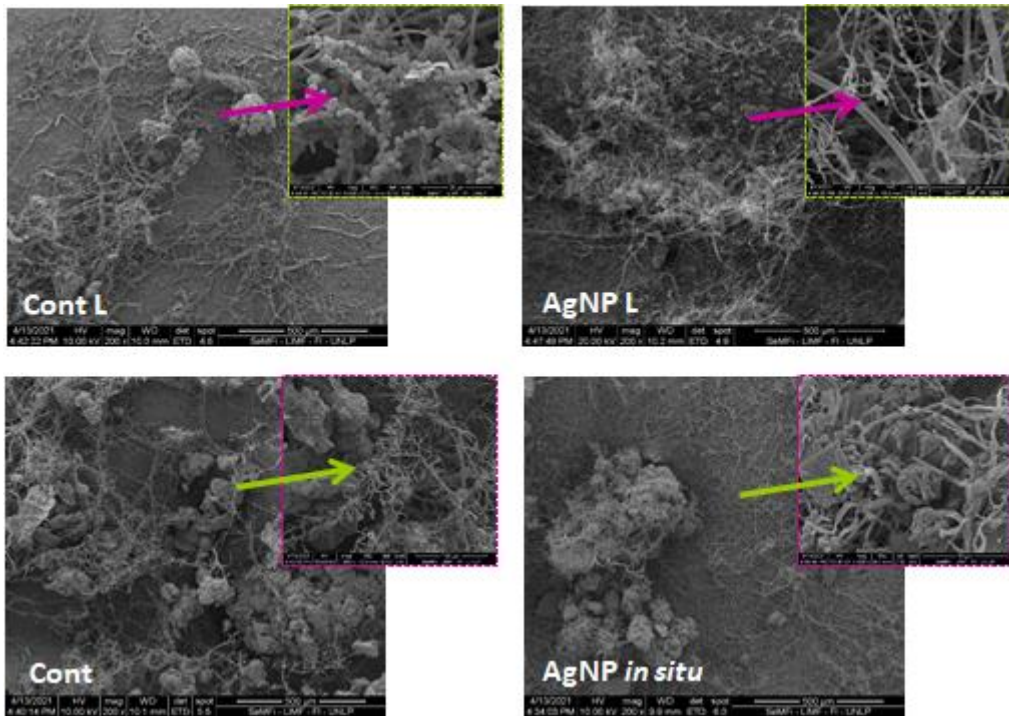


Figura 4.14: Muestras de Cont L y AgNP L (a), y de Cont y de AgNP *in situ* (b) luego de 87 días de degradación observadas con el microscopio electrónico de barrido. La magnificación utilizada se indica en cada micrografía.

4.3.1. Ecotoxicidad del compost

Considerando que el ensayo sobre la evaluación de la germinación de semillas de lechuga se realizó bajo condiciones ambientales, se observaron brotes a los 4 días de sembradas las semillas para las muestras control y en los compost provenientes de la biodesintegración de películas con nanopartículas de plata sintetizadas *in situ*, mientras que el resto de las muestras necesitaron un día más, germinando a los 5 días. Estos resultados se presentan en la Figura 4.15. A partir de lo observado se puede inferir que la desintegración de las películas estudiadas no aportó al compost sustancias con actividad fitotóxica bajo las condiciones evaluadas.



Figura 4.15: Evaluación del efecto fitotóxico de los compost derivados de la biodesintegración de películas nanocompuestas sobre la germinación de semillas de lechuga.

4.4. Análisis por componentes principales de la integración de las propiedades que condicionan el uso de los materiales nanocompuestos

Primeramente se analizó la correlación entre los resultados de los ensayos de citotoxicidad y de migración de los materiales nanocompuestos desarrollados que incluyen nanopartículas obtenidas por técnicas de síntesis química (AgNP *in situ* y AgNP L). Los resultados del Análisis de Componentes Principales (ACP) se muestran en la Figura 4.16. El 87,3% de la varianza total fue explicada a través de dos componentes principales (CP1=54,8% y CP2=32,5%). La correlación cofenética fue de 0,984 indicando que el agrupamiento de variables sería adecuado. Sin embargo el gráfico biplot (Figura 4.16) muestra que las películas nanocompuestas como sus respectivos controles se

ubicaron cerca de los ejes, lo que evidencia la complejidad de los sistemas analizados y que la asignación de CP1 y CP2 no es trivial. Es importante remarcar que las películas nanocompuestas AgNP *in situ* se ubicaron junto a las variables diámetro de partículas (dp), cantidad de Ag que migró en el simulante acuoso luego de 7 días (Ag/agua) y la necrosis/apoptosis de las células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Esta ubicación no es casual ya que las AgNP sintetizadas *in situ* presentaron los mayores diámetros, potencial Z mayor y, las películas que las contenían fueron las que más afectaron la viabilidad de las células THP-1 diferenciadas (en comparación con sus controles y AgNP L, Figura 4.7) probablemente debido a la mayor migración de Ag desde el material.

Tampoco resulta casual la ubicación de las películas nanocompuestas con AgNP L en cercanías de la solubilidad a 25°C y de la viabilidad de las células Vero, para las cuales se consideró la hipótesis del efecto antiinflamatorio de los compuestos fitoquímicos que podrían estar estabilizando las nanopartículas (Figura 4.6). La viabilidad de las células Caco-2 se ubica en dirección opuesta a la de las Vero, estando esta localización en sintonía con la disminución de la viabilidad de este tipo de células en las muestras con los compuestos activos del limón (Figura 4.6).

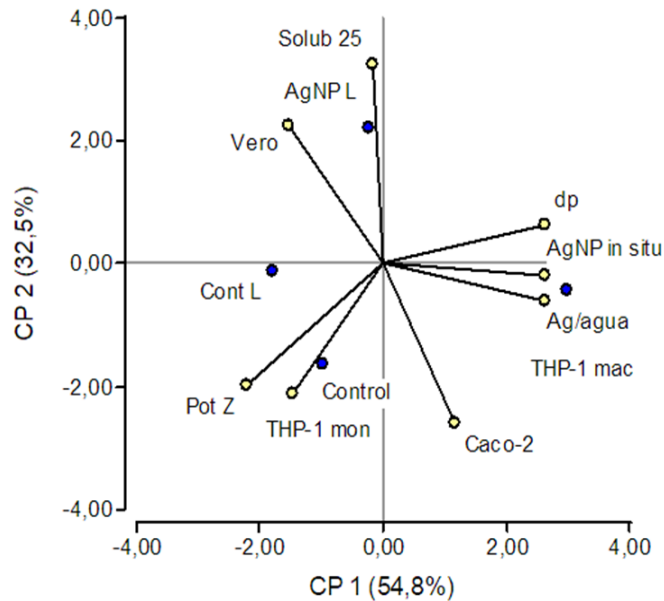


Figura 4.16. Gráfico Biplot resultante del análisis por componentes principales (ACP) de la viabilidad de las tres líneas celulares ensayadas y las características de los materiales nanocompuestos (puntos amarillos) conteniendo AgNPs obtenidas por técnicas de síntesis química (AgNP *in situ* y AgNP L) y sus respectivos controles, (puntos azules). Las propiedades analizadas fueron: la viabilidad de las células Caco-2, Vero y el % de células THP-1 (monocitos y macrófagos) positivas al IP, la cantidad de Ag que migró al simulante acuoso al cabo de 7 días (Ag/agua), la solubilidad de las películas a 25 °C y características de las nanopartículas como el diámetro medio (dp) y el potencial Z de las suspensiones que las contienen.

Asimismo, los resultados de las propiedades relevantes de los materiales nanocompuestos desarrollados que incluyen nanopartículas obtenidas por técnicas de síntesis química (AgNP *in situ* y AgNP L) se integraron con los de los ensayos de citotoxicidad y de biodegradación mediante el Análisis de Componentes Principales (ACP). Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico bidimensional correspondiente (Figura 4.17), la inclusión de la cantidad de Ag que migró al cabo de 7 días en los simulantes se consideró pero dado que no arrojaba información nueva en relación a la analizada en la Figura (4.16), para no saturar el biplot se decidió no incluirla. El 84,3% de la varianza total se pudo explicar través de dos componentes principales, la primera (CP1, que explicó el 55,5%) discriminó entre los controles y los materiales nanocompuestos y la segunda (CP2, que describió el 28,8% de la varianza total) se

asoció a la técnica de obtención de las nanopartículas, diferenciando entre las síntesis químicas verdes y además separó los controles, lo que resulta esperable dado el agregado de jugo de limón de Cont L. Todas las variables analizadas se explicaron por la combinación de ambas componentes, la correlación cofenética (0,960) indica que la agrupación de variables fue adecuada. El gráfico biplot (Figura 4.17) muestra que la biodegradación y la relación de absorbancias de los picos a 1022/995 (que se asocia a la contribución de las zonas amorfas) se ubicaron en el mismo cuadrante y en oposición con el módulo elástico (ME), como era de esperar. En este sentido, la WVP se correlaciona de forma inversa con la contribución de las zonas amorfas.

Por su parte el % de células THP-1 diferenciadas a macrófagos positivas al IP y la viabilidad de las células Caco-2 se ubican en el entorno de las películas con AgNP *in situ*, que poseen además, los diámetros de partículas mayores y fueron las que más afectaron la citotoxicidad de los materiales nanocompuestos. Asimismo, las películas de AgNP L se ubican en cercanías de la elongación del material, de la WVP y de la solubilidad, lo que puede explicarse considerando los resultados del Capítulo 2, en contraposición se ubica la viabilidad de las células Caco-2, que se vio afectada por la presencia de los compuestos activos del jugo que estabilizan las nanopartículas sintetizadas.

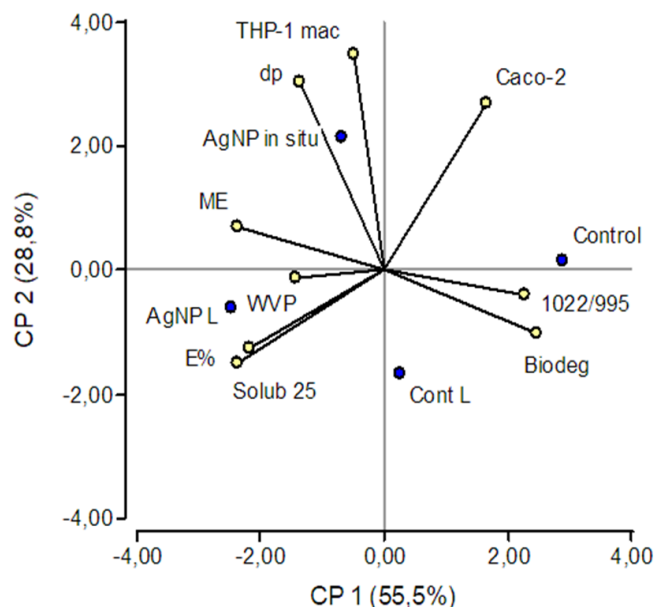


Figura 4.17. Gráfico Biplot resultante del análisis por componentes principales (ACP) de las propiedades relevantes que condicionan las aplicaciones de los materiales nanocompuestos (puntos amarillos) conteniendo AgNPs obtenidas por técnicas de síntesis química (*AgNP in situ* y *AgNP L*) y sus respectivos controles, (puntos azules). Las propiedades analizadas fueron: la viabilidad de las células Caco-2 y el % de células THP-1 diferenciadas a macrófagos positivas al IP, la solubilidad de las películas a 25 °C, la WVP, las propiedades mecánicas (elongación -%E- y módulo elástico -ME), la biodegradación a los 91 días (Biodeg) y la relación de absorbancias de los picos de FTIR 1022/995.

4.5. Evaluación de costos de producción materiales nanocompuestos y legislación vigente

4.5.1. Evaluación de los costos de producción

Intentar llevar la investigación desde el laboratorio hacia el mercado es un gran desafío y es altamente probable encontrar dificultades que limiten el escalado de productos y procesos innovadores. Con este fin, el principal reto se encuentra en el desarrollo de una solución viable tanto desde el punto de vista tecnológico como económico, y que sea coherente con las demandas de los consumidores. Según lo publicado por Padmanabhan, Cruz-Romero, Kerry, y Morris (2018) un trabajo de desarrollo innovador implica:

- a) comprensión de la tecnología, y de las áreas de aplicación,

- b) probar la efectividad del producto, en base a los desarrollos tecnológicos, a inversores, fabricantes, clientes y cualquier organismo regulador,
- c) desarrollar métodos prácticos que faciliten el escalado de la tecnología, y de los procesos de producción asociados a la fabricación del producto en gran volumen,
- d) consideración de costos (tanto de producción como de capital)
- e) consideración de los impactos y beneficios sociales asociados.

La nanotecnología es un área de investigación activa en el campo de la medicina y sensores, sin embargo las aplicaciones en el área de envases para alimentos son incipientes, si bien en los últimos años se encuentran en crecimiento sostenido, con una estimación de 400 empresas dedicadas al desarrollo en este sector. Durante 2013, se estimó que la industria de los envases con nanotecnología tenía un valor de \$6500 millones, con un crecimiento esperado de hasta \$15000 millones para 2020 (Bumbudsanpharoke y Ko, 2015b). Si bien los envases activos contribuyen de manera significativa a este crecimiento, los expertos creen que la nanotecnología se encuentra en una etapa inicial, ya que su uso en el envasado de alimentos es bajo en comparación con otras industrias. Aunque hay una serie de empresas que ofrecen soluciones de envases con nano-activos para la industria de los alimentos y las bebidas, un número limitado de compradores ha mostrado interés con estas empresas. La preferencia de los consumidores por los productos alimenticios naturales ha sido el principal factor limitante para la implementación de tecnologías de nano-envases para alimentos (Padmanabhan y col., 2018). Sin embargo, un mayor desarrollo de estas tecnologías en conjunto con pruebas sobre evaluación de riesgos, podrían contribuir a disipar las preocupaciones de los consumidores y permitir un mayor desarrollo del mercado de los envases activos para alimentos.

En este trabajo de Tesis se realizó un análisis de costos de producción de las películas nanocompuestas. Para ello, se consideraron los precios de mercado de los componentes de las formulaciones: almidón de maíz, glicerol y nitrato de plata, maltosa y limón.

En la Tabla 4.6 se presenta el análisis de los costos de materias primas correspondientes a películas nanocompuestas a base de almidón. Para calcular el costo de las películas correspondiente a cada formulación se consideró que para obtener 1 m² de película, se necesitan 3140 g de suspensión filmogénica, es decir, que se trabajó con una relación

de moldeo constante de 3,14 kg/m². Así, en función de la composición de cada película nanocompuesta y de la relación de moldeo, se estimaron los costos de las materias primas por 1m² de material. No se consideraron en este cálculo estimativo ni el gasto energético asociado ni los derivados de salarios ni amortización del equipamiento utilizado.

Tabla 4.6: Reactivos utilizados para obtener las películas con AgNP *in situ* y costos de su producción.

Componentes Precio (u\$s)	Contenido en la suspensión para 1 m ²	Contribución al costo (u\$s)
Almidón de maíz "Maizena"(1,50/Kg)	94,2000 g	0,14
Maltosa monohidrato (106/500g)*	0,8164 g	0,17
AgNO ₃ , ACS, 99,9+% (87,90/25g)*	0,7062 g	2,48
Glicerol, ACS, 99,9+% (111/L)*	28,2600 g	2,48
Costo total para 1 m² de película		5,27

Los costos de los reactivos se obtuvieron de la página www.alfa.com, excepto el del almidón de maíz que se tomó de Mercado Libre Argentina (www.mercadolibre.com.ar).

Por otra parte, Argentina es uno de los principales productores de limón a nivel mundial, consolidándose en 2017 en primer lugar. El precio de este *commodity* es de u\$s 962/ton (www.alimentosargentinos.gob.ar). Se ha estimado que se necesitan aproximadamente 250 g de limones para obtener 100 ml de jugo. Así, el costo de 100 ml de jugo de limón sería de u\$s 0,24. Así, el costo de producción de 1m² de películas con AgNP L sería de (Tabla 4.8):

Tabla 4.8: Costos de producción de 1m² de películas nanocompuestas conteniendo AgNP L

Componentes Precio (u\$s)	Contenido	Contribución al costo (u\$s)
Jugo de limón (0,24/100 mL)	80 mL	0,24
AgNO ₃ , ACS, 99,9+% (87,90/25g)*	0,0221 g	0,08
Costo total para 100 ml de AgNP L		0,32
Almidón de maíz "Maizena"(1,50/Kg)	94,2000 g	0,14
AgNP L	60,4 mL	0,19
Glicerol, ACS, 99,9+% (111/L)*	28,2600 g	2,48
Costo total para 1 m² de película		2,81

Los costos de los reactivos se obtuvieron de la página www.alfa.com, excepto el del almidón de maíz que se tomó de Mercado Libre Argentina (www.mercadolibre.com.ar) y el del limón de www.alimentosargentinos.gob.ar.

Además, es importante señalar que, de las cáscaras, pulpas y semillas remanentes de la obtención del jugo de limón se pueden obtener subproductos de alto valor agregado, como el aceite esencial de limón y las pectinas cítricas, así como concentrados, cremogenados y otros derivados. Además, los extractos de cáscara de cítricos se pueden utilizar para obtener nanopartículas de plata (Kahrilas y col., 2013, Kaviya y col., 2011). Por lo que el aprovechamiento de subproductos y residuos contribuye al diseño de procesos sustentables, considerando las premisas de la economía circular.

4.5.2. Legislación Vigente

En los materiales en contacto con alimentos, como en otras áreas, algunas sustancias se pueden incorporar en forma de nanopartículas para aumentar así la funcionalidad del mismo. El desafío para la industria y las autoridades es evaluar si el comportamiento migratorio de los nanomateriales es diferente al de los materiales tradicionales y, si las sustancias que migran son más reactivas y/o tienen un perfil toxicológico diferente al de las sustancias que ya están reguladas (Veraart y Rijk, 2010). Las respuestas a estas

preguntas determinarán si son necesarios requisitos específicos para los nanomateriales y si existe la necesidad de una medida de ejecución específica. La UE está desarrollando estrategias generales de políticas sobre nanomateriales, nanopartículas y nanotecnología a nivel horizontal, es decir que se incluyan medidas para la formación de capital humano, de apoyo a actividades de producción, incluyendo certificaciones y controles de calidad e incentivos para infraestructura. Según el Reglamento Marco (Reglamento (CE) nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y el Consejo de la UE sobre materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, 27/10/2004), un operador comercial que utilice una sustancia autorizada tiene la obligación de informar a la Comisión de cualquier nueva información científica o técnica que pueda afectar a la evaluación de la seguridad de la sustancia autorizada (Veraart y Rijk, 2010).

A pesar de todas las revisiones realizadas hasta la fecha con respecto a los nanomateriales, muchos elementos del marco legislativo existente aún presentan una gran cantidad de debilidades. Por ejemplo, no hay una descripción general de qué y cuánto se produce, qué se utiliza y por qué. Además, tampoco se sabe fehacientemente cómo interactúan los diferentes nanomateriales con los sistemas vivos y cómo evaluar la posible toxicidad asociada. Asimismo, hay escasos datos sobre la exposición y los peligros ambientales relacionados a los nanomateriales y todavía se carece de métodos de prueba que permitan evaluar la seguridad de los mismos (Hansen, 2017).

Luego de haber revisado minuciosamente la legislación existente para abordar este problema, los representantes de la Comisión Europea han reconocido que los nanomateriales son "difíciles de regular" debido a la falta de información, su complejidad, y un marco regulatorio adaptado a los productos químicos, más que a los materiales manufacturados (Categorisation of Manufactured Nanomaterials: Workshop Report ENV/JM/MONO(2016)9 (OECD, 2016); <http://go.nature.com/2uQY5IS>). En este sentido, Hansen (2017) propuso un marco legislativo adaptado a los nanomateriales y sus aplicaciones denominado Registro, Evaluación, Autorización, Categorización y herramientas para evaluar nanomateriales: oportunidades y debilidades (REACT NOW). Según este autor los fabricantes e importadores de nanomateriales deben registrar sus productos antes de la comercialización, independientemente de los volúmenes de producción e importación (Hansen, 2013). En el caso de los nanomateriales que ya se

comercializan, se debe exigir a los fabricantes e importadores que se registren y cumplan los requisitos de REACT NOW dentro de los seis meses posteriores, mientras que, las actividades de producción y procesos relacionadas con investigación y desarrollo se encuentran exentos. Para este proyecto, un material se considera un nanomaterial cuando más del 0,15% de la distribución del tamaño de partícula es <100 nm o, para materiales secos, cuando el área de superficie específica en relación al volumen es >60 $\text{m}^2 \text{cm}^{-3}$, como sugiere el Comité Científico de la Comisión Europea sobre Riesgos Sanitarios Emergentes y Recientemente Identificados (SCENIHR) (Scientific Basis for the Definition of the Term "Nanomaterial" (SCENIHR, 2010); <http://go.nature.com/2uidBul>).

Esta reglamentación sugiere que para garantizar la protección de la salud y el medio ambiente antes de la comercialización, debe explicarse el uso y la eficacia del nanomaterial, así como también justificarse la necesidad de su aplicación. En caso de duda, el Centro Común de Investigación de la Comisión Europea (EC-JRC) debe proporcionar apoyo técnico y científico, especialmente a las pequeñas y medianas empresas (PYMEs).

Hansen y col. (2011) desarrollaron una herramienta llamada NanoRiskCat que permite realizar una categorización del riesgo de los materiales, la cual ayudaría a las empresas y entes reguladores a identificar, evaluar, clasificar y comunicar lo que saben sobre la exposición y potenciales peligros de los nanomaterial utilizados en productos de consumo. Es así que, una vez registrados los productos son evaluados con esta herramienta, y finalmente se obtiene una conclusión breve que describe el uso previsto del nanomaterial, por ejemplo, TiO_2 en protector solar o nanotubos de carbono en pintura de barcos, y a continuación un código de color, en el que los primeros tres círculos se refieren a la posible exposición de los usuarios (profesional, consumidor o medio ambiente) y los últimos dos se refieren al potencial peligro para seres humanos y medio ambiente. Los colores asignados pueden ser rojo, amarillo, verde y gris, indicando alto, medio, bajo y desconocido, potencial de exposición o peligro, respectivamente (Figura 4.18).

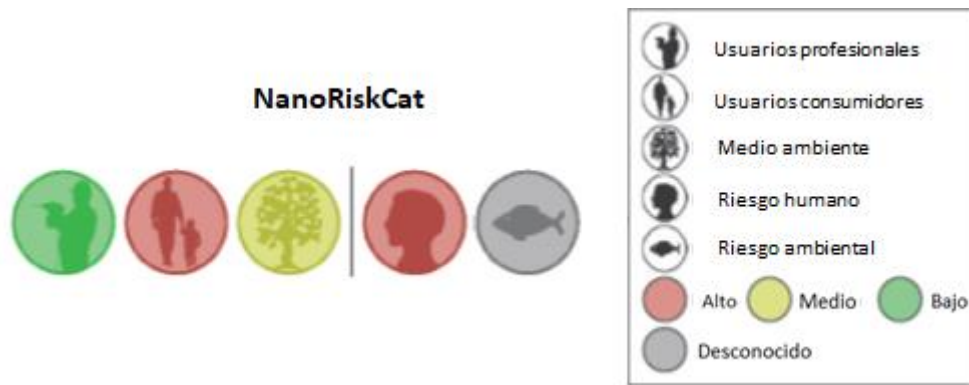


Figura 4.18: Ejemplo de una evaluación con NanoRiskCat sobre la exposición y el riesgo potencial de un nanoproducto. (Imagen adaptada de Hansen y col. 2017).

Si se planteara hipotéticamente el uso de esta herramienta para la evaluación de riesgos asociado al uso de las películas desarrolladas en el presente trabajo de Tesis y considerando los resultados obtenidos de citotoxicidad, ensayos de migración y de biodegradación y ecotoxicidad, las etiquetas de NanoRiskcat serían las mostradas en la Figura 4.19.

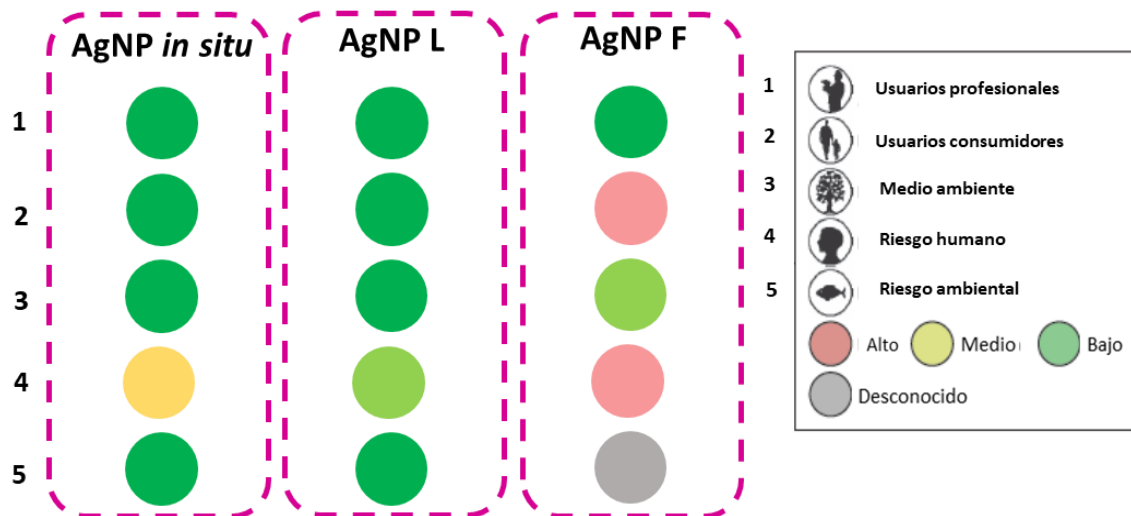


Figura 4.19: Evaluación con NanoRiskCat sobre la exposición y el riesgo potencial de los materiales nanocompuestos desarrollados en este trabajo de Tesis.

5. CONCLUSIONES

El estudio del efecto citotóxico de los diferentes nanomateriales desarrollados en este trabajo de Tesis indicó que las muestras conteniendo nanopartículas de plata sintetizadas por ablación láser son más tóxicas a diferencia del resto de los materiales, sobre las líneas celulares Caco-2 y Vero en las condiciones ensayadas, disminuyendo la viabilidad celular en aproximadamente un 60% para ambas líneas. Por el contrario, las muestras menos citotóxicas fueron las de AgNP L, en donde los agentes activos del jugo de limón reducirían dicho efecto.

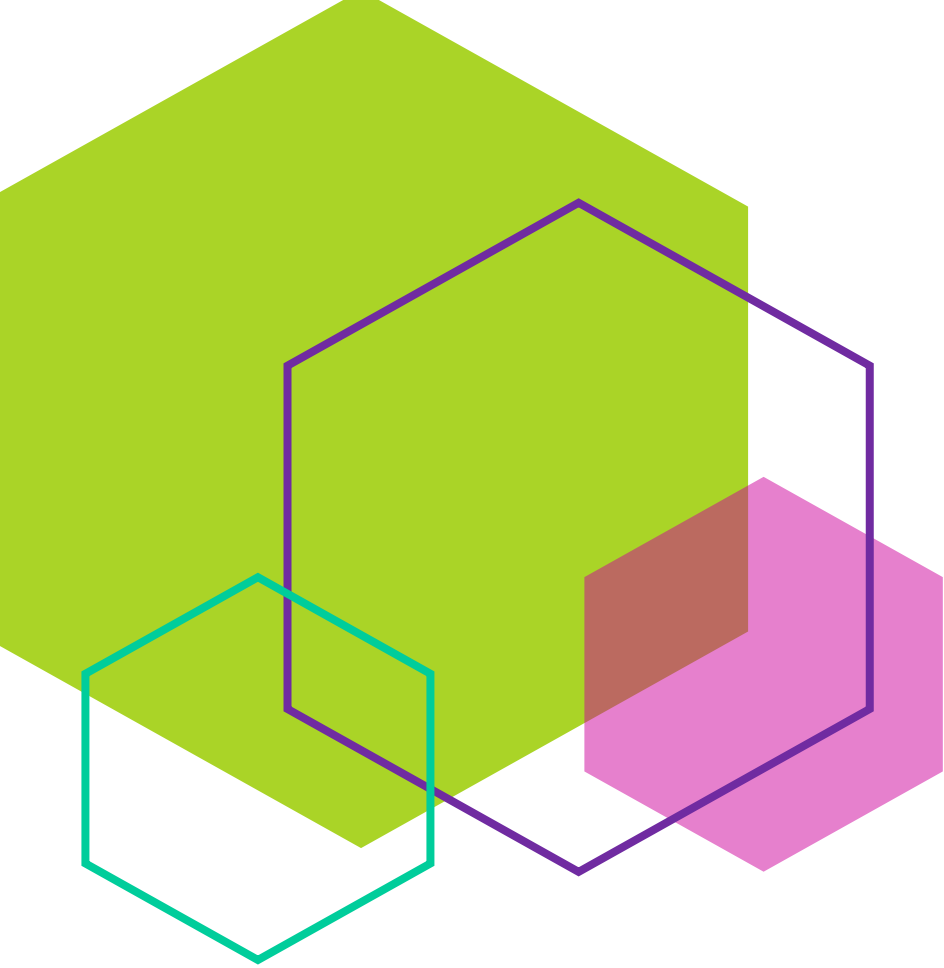
Debido a que la exposición a NPs afecta incluso a las líneas fagocíticas como los macrófagos THP-1, también se estudió el efecto de las películas nanocompuestas sobre éstas. Después de las AgNP F, las AgNP sintetizadas *in situ* fueron las que más afectaron la viabilidad de las células THP-1 diferenciadas. Este comportamiento tiene su explicación en función al tamaño, potencial Z, y tipo de recubrimiento presente en las nanopartículas de plata obtenidas. Para las AgNP *in situ* este efecto probablemente esté asociado con la mayor migración de Ag desde el material nanocompuesto.

Se estudió la migración de las nanopartículas (AgNP *in situ* y AgNP L) desde el material nanocompuesto a tres simulantes alimentarios modelando los resultados obtenidos a través de diferentes modelos ampliamente aceptados para describir estos procesos. En cuanto al contenido de Ag liberado al simulante (ppm, mg de Ag que migró por cada kg de simulante) se observó que éste fue mayor para las películas con AgNPs sintetizadas *in situ* que para las que contenían AgNP L. Esto también está asociado con las diferentes concentraciones de Ag que contienen ambos materiales nanocompuestos. Independientemente de los valores máximos obtenidos estos se encuentran por debajo del límite establecido por la legislación vigente. Sin embargo, debe considerarse que al trasladar estos resultados a la aplicación real sobre un alimento existe la posibilidad de que ocurra transferencia de nanopartículas por otros procesos además de la migración, ya que las condiciones de uso reales pueden introducir nuevos factores que se desvíen de las condiciones asumidas en los modelos matemáticos utilizados. Se demostró la biodegradación de los materiales desarrollados en un período de 90 días. El ensayo de ecotoxicidad permitió inferir que la biodegradación de las películas estudiadas no aportó

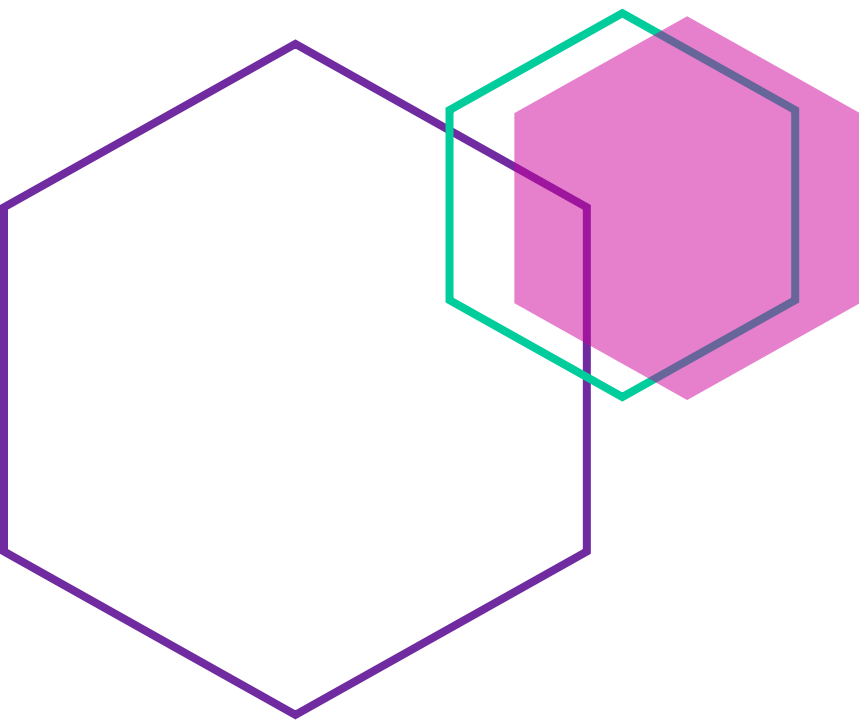
al compost sustancias con actividad fitotóxica bajo las condiciones ambientales evaluadas permitiendo la germinación de especies de rápido crecimiento indicadoras de fitotoxicidad.

El análisis por componentes principales fue una herramienta muy útil que permitió integrar las características de las nanopartículas obtenidas por diferentes técnicas verdes de obtención con las propiedades relevantes de los materiales desarrollados que condicionan su posterior aplicación integrando además los resultados de migración y de citotoxicidad.

Finalmente, con fines a una futura aplicación de los nanomateriales desarrollados se evaluaron los costos de producción y el marco legislativo vigente que contempla a este tipo de materiales.



Conclusiones generales



En este trabajo de Tesis fue posible sintetizar nanopartículas de plata a través de técnicas de síntesis tanto químicas por reducción de la sal de Ag con reductores naturales como físicas asistidas por ablación láser.

Fue posible acoplar la síntesis de nanopartículas de plata mediante el uso de reductores amigables con el medioambiente a la preparación de suspensiones filmogénicas a base de almidón en diferentes concentraciones ya sea de AgNPs *in situ* como de almidón. En el caso de la síntesis de nanopartículas utilizando los componentes activos del jugo de limón, se optimizaron las condiciones de síntesis (90 ° C durante 30 min).

La ablación láser en medio líquido permitió obtener nanopartículas de plata (AgNP F) en corto tiempo ya que es una técnica simple que requiere pocos pasos.

Las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron a través de la observación del plasmón por espectrofotometría. Mediante TEM y SEM se determinó que las mismas presentaban morfología esférica con tamaños que dependían de la técnica de síntesis, siendo menor para las obtenidas por ablación láser. Las medidas de potencial Z indicaron que las AgNPs resultaron estables, particularmente las obtenidas con jugo de limón que pudieron ser almacenadas durante tiempos prolongados al resguardo de la luz.

Se caracterizó el comportamiento reológico de las suspensiones filmogénicas evaluando el efecto de tanto el agregado de nanopartículas como el contenido de almidón de la formulación. La cinética de secado estuvo condicionada por el contenido de almidón de los sistemas estudiados.

Las nanopartículas sintetizadas por vía química (AgNP *in situ* y AgNP L) reforzaban las matrices que las contenían. Esto se evidenció a través de las propiedades mecánicas analizadas (módulo elástico, esfuerzo ténsil y tenacidad) así como la WVP y la capacidad antimicrobiana fue dependiente de la concentración de AgNPs en los materiales compuestos. Respecto a la caracterización microestructural de los sistemas nanocompuestos; mediante SEM se evidenció que las AgNPs se encontraban integradas en la matriz poliméricas y a través de ATR-FTIR se confirmó la participación de los grupos OH del almidón en la estabilización de las AgNPs sintetizadas.

Considerando la capacidad antimicrobiana y las propiedades finales de los materiales obtenidos, se seleccionaron las películas nanocompuestas formuladas con un contenido de almidón del 3 % y una concentración de 143 ppm de AgNPs sintetizadas *in situ*. Cuando esta misma concentración se agregó de AgNP F sintetizadas por ablación láser las películas resultaron con coloración amarilla y además no se observó el refuerzo de la matriz.

Por otra parte, en el caso de los materiales con AgNP L agregadas, los que contenían 71,5 ppm mejoraron tanto las propiedades de barrera al vapor de agua como la resistencia mecánica, mantuvieron su capacidad de sellado térmico y presentaron capacidad antimicrobiana contra bacterias indicativas de buenas prácticas de fabricación, observándose en este caso un efecto sinérgico con los fitoquímicos presentes en el jugo.

En este sentido, se demostró que el agregado de jugo de limón a las matrices afecta el desempeño de las mismas, siendo este efecto atribuido al ácido cítrico presente en el jugo.

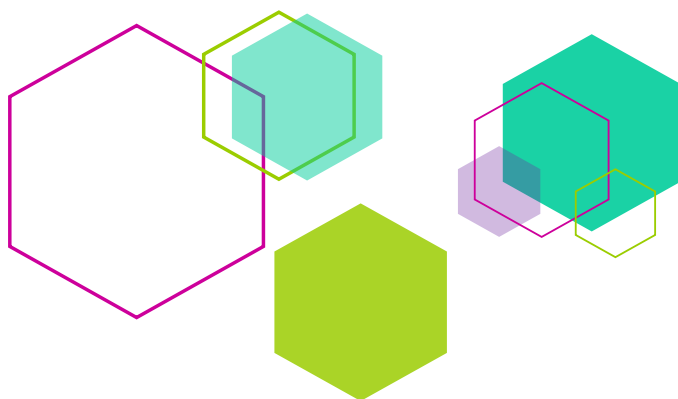
La citotoxicidad de los materiales desarrollados se evaluó a través de 3 líneas celulares ampliamente utilizadas con este fin. Las muestras conteniendo nanopartículas de plata sintetizadas por ablación láser disminuyeron 60% la viabilidad de las células Caco-2 y Vero. Después de las AgNP F, las AgNP sintetizadas *in situ* fueron las que más afectaron la viabilidad de las células THP-1 diferenciadas. Se pudo relacionar la citotoxicidad con las características de las nanopartículas (tamaño, potencialZ, y tipo de recubrimiento presente).

La migración de las nanopartículas (AgNP *in situ* y AgNP L) desde el material nanocompuesto a tres simulantes alimentarios se estudió mediante un ensayo acelerado. Se modeló el proceso y se dilucidó el mecanismo operante. Se cuantificó la cantidad de Ag que migró al simulante, siendo los valores mayores para los materiales nanocompuestos con AgNPs sintetizadas *in situ* que para las que contenían AgNP L. De todas formas, los valores máximos obtenidos se encuentran por debajo del límite establecido por la legislación vigente.

Se demostró la biodegradación de los materiales desarrollados en un período de 90 días sin efectos ecotóxicos del compost remanente, evaluado a través de la germinación de especies de rápido crecimiento indicadoras de fitotoxicidad.

El análisis por componentes principales permitió integrar las características de las nanopartículas sintetizadas por diferentes vías con las propiedades relevantes de los materiales nanocompuestos que las contienen y que condicionan su posterior aplicación integrando además los resultados de citotoxicidad, migración y biodegradación.

Finalmente se propusieron dos aplicaciones en el área de alimentos. Así se desarrollaron envases activos por termosellado de los materiales conteniendo AgNP *in situ* (143 ppm) los que permitieron extender en 7 días la vida útil de quesos de pasta blanda. Además, las películas nanocompuestas con agregado de 71,5 ppm de AgNP L se utilizaron como separadores de rebanadas de pan lacteado y se evaluó su desempeño en relación a su contraparte sintética (LDPE). Se evaluaron los costos de producción y el marco legislativo vigente que contempla a este tipo de materiales, siendo necesario aún avanzar en este sentido.



REFERENCIAS

- Abreu, A. S., Oliveira, M., De Sá, A., Rodrigues, R. M., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., & Machado, A. V. (2015). Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. *Carbohydrate Polymers*, 129, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.021>
- Afanador, E. O. ., & Pimiento, L. P. R. (2007). Química verde del siglo XXI; química verde, una química limpia. *Revista Cubana de Química*, 19(1), 29–32.
- Agustinelli, S. P., Ciannamea, E. M., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. (2021). Migration of red grape extract components and glycerol from soybean protein concentrate active films into food simulants. *Food Hydrocolloids*, 120(March), 106955. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106955>
- Albeladi, A. B., AL-Thabaiti, S. A., & Khan, Z. (2020). Effect of CTAB on the surface resonance plasmon intensity of silver nanoparticles: Stability and oxidative dissolution. *Journal of Molecular Liquids*, 302. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112565>
- Ali, A., Xie, F., Yu, L., Liu, H., Meng, L., Khalid, S., & Chen, L. (2018). Preparation and characterization of starch-based composite films reinforced by polysaccharide-based crystals. *Composites Part B: Engineering*, 133, 122–128. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2017.09.017>
- Alvarez, A., Jorrat, S., & Genta, M. (2005). Caracterización físico-química de jugo de limón de Tucumán. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 34(2), 49–56. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86434204>
- Amendola, V., Scaramuzza, S., Agnoli, S., Granozzi, G., Meneghetti, M., Campo, G., ... Nodari, L. (2015). Laser generation of iron-doped silver nanotruffles with magnetic and plasmonic properties. *Nano Research*, 8(12), 4007–4023. <https://doi.org/10.1007/s12274-015-0903-y>
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Reimon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., ... Lamuela-Raventós, R. M. (2009). Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability* (pp. 53–88). <https://doi.org/10.1002/9780813809397.ch2>
- Arboleda, D. M., Santillán, J. M. J., Arce, V. B., Fernández van Raap, M. B., Muraca, D.,

- Fernández, M. A., ... Scaffardi, L. B. (2018). A simple and “green” technique to synthesize long-term stability colloidal Ag nanoparticles: Fs laser ablation in a biocompatible aqueous medium. *Materials Characterization*, *140*(December 2017), 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2018.04.021>
- Arce, V. B., Santillán, J. M. J., Muñetón Arboleda, D., Muraca, D., Scaffardi, L. B., & Schinca, D. C. (2017). Characterization and Stability of Silver Nanoparticles in Starch Solution Obtained by Femtosecond Laser Ablation and Salt Reduction. *Journal of Physical Chemistry C*, *121*(19), 10501–10513. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b12384>
- Arrieta, M P, Fortunati, E., Dominici, F., Ray, E., Opez, J. L., & Kenny, J. M. (2014). PLA-PHB/cellulose based films: Mechanical, barrier and disintegration properties. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.05.010>
- Arrieta, Marina P., López, J., Ferrándiz, S., & Peltzer, M. A. (2013). Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. *Polymer Testing*, *32*(4), 760–768. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2013.03.016>
- AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials. *ACS Nano*, *2*(2), 383–386.
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, *48*, 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2015.12.001>
- Barry, M., Ding, B., Jung, Y., Reddy, B. V. K., Phuoc, T. X., & Chyu, M. K. (2014). Pulsed nanosecond laser ablation of gold in deionized water and aqueous chitosan solution. *Optics and Lasers in Engineering*, *55*, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2013.10.019>
- Barth, J. V., Costantini, G., & Kern, K. (2009). Engineering atomic and molecular nanostructures at surfaces. *Nanoscience and Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*, *437*(September), 67–78. https://doi.org/10.1142/9789814287005_0008
- Bertuzzi, M. A., Armada, M., Gottifredi, J. C., López, O. V, Zaritzky, N. E., García, M. A., ... Pal, B. (2012). Bionanocomposites materials for food packaging applications: Concepts and future outlook. *Journal of Food Engineering*, *193*(4), 1–8. <https://doi.org/0718-8706>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bibi I, Nazar N, Iqbal M, et al (2017) Green and eco-friendly synthesis of cobalt-oxide nanoparticle: Characterization and photo-catalytic activity. *Adv Powder Technol* *28*:2035–2043. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.05.008>
- Bindhu, M. R., & Umadevi, M. (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.

<https://doi.org/10.1016/J.SAA.2012.09.031>

- Bodirlau, R., Teaca, C. A., & Spiridon, I. (2013). Influence of natural fillers on the properties of starch-based biocomposite films. *Composites Part B: Engineering*, 44(1), 575–583. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2012.02.039>
- Bof, M. J., Jiménez, A., Locaso, D. E., García, M. A., & Chiralt, A. (2016). Grapefruit Seed Extract and Lemon Essential Oil as Active Agents in Corn Starch–Chitosan Blend Films. *Food and Bioprocess Technology*, 9(12), 2033–2045. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1789-8>
- Böhmert, L., Niemann, B., Thünemann, A. F., & Lampen, A. (2012). Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Archives of Toxicology*, 86(7), 1107–1115. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0840-4>
- Boostani, S., & Jafari, S. M. (2021). A comprehensive review on the controlled release of encapsulated food ingredients; fundamental concepts to design and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 109(January), 303–321. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.040>
- Bumbudsanpharoke, N., & Ko, S. (2015a). Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. *Journal of Food Science*, 80(5), R910–R923. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12861>
- Bumbudsanpharoke, N., & Ko, S. (2015b). Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. *Journal of Food Science*, 80(5), R910–R923. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12861>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, pp. 833–848. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.833>
- Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Pérez, M. A., Figueroa, C. R., Figueroa, N. E., & Sanfuentes, E. A. (2017). Thermoplastic starch/clay nanocomposites loaded with essential oil constituents as packaging for strawberries – In vivo antimicrobial synergy over *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 129, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.03.005>
- Cano, A., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2016). Development and characterization of active films based on starch-PVA, containing silver nanoparticles. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.07.002>
- Castillo, L., López, O., López, C., Zaritzky, N., García, M. A., Barbosa, S., & Villar, M. (2013). Thermoplastic starch films reinforced with talc nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 95(2), 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.026>

- Ceballos, R. L., Ochoa-Yepes, O., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2020). Effect of yerba mate extract on the performance of starch films obtained by extrusion and compression molding as active and smart packaging. *Carbohydrate Polymers*, *244*, 116495. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116495>
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., & Rousset, M. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: Evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science*, *107*(1), 213–225. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.1.213>
- Chen, H., Cui, S., Tu, Z., Gu, Y., & Chi, X. (2011). In vivo Monitoring of Organ-Selective Distribution of CdHgTe/SiO₂ Nanoparticles in Mouse Model. *Journal of Fluorescence* *2011* *22*:2, *22*(2), 699–706. <https://doi.org/10.1007/S10895-011-1005-1>
- Cheng, F., Betts, J. W., Kelly, S. M., & Hector, A. L. (2015). Green synthesis of highly concentrated aqueous colloidal solutions of large starch-stabilised silver nanoplatelets. *Materials Science and Engineering C*, *46*, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.041>
- Cheng, F., Betts, J. W., Kelly, S. M., Schaller, J., & Heinze, T. (2013). Synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using aminocellulose as a combined reducing and capping reagent. *Green Chemistry*, *15*(4), 989. <https://doi.org/10.1039/c3gc36831a>
- Cheng, H., Chen, L., McClements, D. J., Yang, T., Zhang, Z., Ren, F., ... Jin, Z. (2021). Starch-based biodegradable packaging materials: A review of their preparation, characterization and diverse applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, *114*(February), 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.017>
- Cheviron, P., Gouanvé, F., & Espuche, E. (2014). Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, *108*(1), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.059>
- Cheviron, P., Gouanvé, F., & Espuche, E. (2015). Starch/silver nanocomposite: Effect of thermal treatment temperature on the morphology, oxygen and water transport properties. *Carbohydrate Polymers*, *134*, 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.067>
- Cheviron, P., Gouanvé, F., & Espuche, E. (2016). Preparation, characterization and barrier properties of silver/montmorillonite/starch nanocomposite films. *Journal of Membrane Science*, *497*, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.09.039>
- Cho, S.-W., Ullsten, H., Gallstedt, M., & Hedenqvist, M. S. (2007). Heat-Sealing Properties of Compression-Molded Wheat Gluten Films. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, *1*, 56–63. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2007.006>
- Cioban, C., Alexa, E., Sumalan, R., & Merce, I. (2010). Impact of Packaging on Bread

Physical and Chemical Properties. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 67(2).
<https://doi.org/10.15835/buasvmcn-agr:5070>

- Clarance, P., Luvankar, B., Sales, J., ... A. K.-S. J. of, & 2020, undefined. (n.d.). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. *Elsevier*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X19303262>
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Metallic Nanoparticles and Surface Plasmon : a Deep Relationship. *Avances En Ciencia e Ingeniería*, 3(2), 67–78.
- Cruz, D., Falé, P. L., Mourato, A., Vaz, P. D., Luisa Serralheiro, M., & Lino, A. R. L. (2010). Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.025>
- Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., & O'Connor, C. J. (2004). Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chemical Reviews*, 104(9), 3893–3946. <https://doi.org/10.1021/CR030027B>
- D'Souza, S. S., Faraj, J. A., & DeLuca, P. P. (2005). A model-dependent approach to correlate accelerated with real-time release from biodegradable microspheres. *AAPS PharmSciTech*, 6(4). <https://doi.org/10.1208/PT060470>
- Dahl, J. A., Maddux, B. L. S., & Hutchison, J. E. (2007). Toward greener nanosynthesis. *Chemical Reviews*, 107(6), 2228–2269. <https://doi.org/10.1021/CR050943K>
- Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- De Moraes, J. O., Scheibe, A. S., Sereno, A., & Laurindo, J. B. (2013). Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 800–808. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.009>
- De Souza Lima, M. M., & Borsali, R. (2004). Rodlike cellulose microcrystals: Structure, properties, and applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 25(7), 771–787. <https://doi.org/10.1002/marc.200300268>
- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2094–2101. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2009.03.007>
- Desarkar, H. S., Kumbhakar, P., & Mitra, A. K. (2013). One-step synthesis of Zn/ZnO hollow nanoparticles by the laser ablation in liquid technique. *Laser Physics Letters*, 10(5). <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/5/055903>
- Dias, M. V., Sousa, M. M., Lara, B. R. B., de Azevedo, V. M., de Fátima Ferreira Soares,

- N., Borges, S. V., & Queiroz, F. (2018). Thermal and morphological properties and kinetics of diffusion of antimicrobial films on food and a simulant. *Food Packaging and Shelf Life*, 16(November 2017), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.007>
- Dima, J. B., Sequeiros, C., & Zaritzky, N. (2017). Chitosan from Marine Crustaceans: Production, Characterization and Applications. In *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. <https://doi.org/10.5772/65258>
- Dolgaev, S. I., Simakin, A. V., Voronov, V. V., Shafeev, G. A., & Bozon-Verduraz, F. (2002). Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment. *Applied Surface Science*, 186(1–4), 546–551. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(01)00634-1)
- Elizondo, M. C., & Gallo, A. C. (2011). Use of Nanomaterials in Biopolymers for Food. *SciELO*, 77(4), 292–306.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896–902. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.021>
- Estevez-Areco, S., Guz, L., Famá, L., Candal, R., & Goyanes, S. (2019). Bioactive starch nanocomposite films with antioxidant activity and enhanced mechanical properties obtained by extrusion followed by thermo-compression. *Food Hydrocolloids*, 96(March), 518–528. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.054>
- Fechner, P. M., Wartewig, S., Kiesow, A., Heilmann, A., Kleinebudde, P., & Neubert, R. H. H. (2005). Influence of water on molecular and morphological structure of various starches and starch derivatives. *Starch/Staerke*, 57(12), 605–615. <https://doi.org/10.1002/star.200500410>
- Fennema, O. (2008). *Fennema QUIMICA DE LOS ALIMENTOS* (3rd ed.). Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.
- Flores, C. Y., Miñán, A. G., Grillo, C. A., Salvarezza, R. C., Vericat, C., & Schilardi, P. L. (2013). Citrate-capped silver nanoparticles showing good bactericidal effect against both planktonic and sessile bacteria and a low cytotoxicity to osteoblastic cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(8), 3149–3159. <https://doi.org/10.1021/am400044e>
- Fortunati, E., Luzi, F., Yang, W., Kenny, J. M., Torre, L., & Puglia, D. (2018). Bio-based nanocomposites in food packaging. In *Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00004-8>
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., & Axelsson, A. (2011). The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1–2), 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>
- Gao, X., Wei, L., Yan, H., & Xu, B. (2011). Green synthesis and characteristic of core-shell

- structure silver/starch nanoparticles. *Materials Letters*, 65(19–20), 2963–2965. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.06.020>
- García Lidón, A., Del Río, J. A., Porras, I., Fuster, M. D., & Ortuño, A. (2003). El limón y sus componentes bioactivos. In *Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Serie Técnica*. Región de Murcia: Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente.
- García, M. A., Pinotti, A., & Zaritzky, N. E. (2006). Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. *Starch - Stärke*, 58(9), 453–463. <https://doi.org/10.1002/star.200500484>
- García, M. a, Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (1998). Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria x Ananassa*) quality and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3758–3767. <https://doi.org/10.1021/jf980014c>
- Gautam, N., & Kaur, I. (2013). Soil burial biodegradation studies of starch grafted polyethylene and identification of *Rhizobium meliloti* therefrom. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 5(June), 147–158. <https://doi.org/10.5897/JECE09.022>
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., & Entezami, A. A. (2011). Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.016>
- Ghosh, S., Kaushik, R., Nagalakshmi, K., Hoti, S. L., Menezes, G. A., Harish, B. N., & Vasan, H. N. (2010). Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar-agar matrix as a thin film. *Carbohydrate Research*, 345(15), 2220–2227. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.08.001>
- Gloria, G. B., & Oscar, C. D. (2003). Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. *Revista Ingeniería e Investigación*, 52(July 2016), 5–17.
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J. -L. (1992). Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- González-Ballesteros, N., Prado-López, S., Rodríguez-González, J. B., Lastra, M., & Rodríguez-Argüelles, M. C. (2017). Green synthesis of gold nanoparticles using brown algae *Cystoseira baccata*: Its activity in colon cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.020>
- González Blair, G. H., & Castellanos Domínguez, Ó. F. (2003). Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. *Revista Ingeniería e Investigación*, 52(July 2016), 5–17.

- Goutam SP, Saxena G, Singh V, et al (2018). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using leaf extract of *Jatropha curcas* L. for photocatalytic degradation of tannery wastewater. *Chem Eng J* 336:386–396. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.029>
- Guz, L., Famá, L., Candal, R., & Goyanes, S. (2017). Size effect of ZnO nanorods on physicochemical properties of plasticized starch composites. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1611–1619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.041>
- Guzman, M., Dille, J., & Godet, S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Vol. 8, pp. 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.007>
- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., ... Kleinsasser, N. (2011). Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*, 201(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.001>
- Haider, M. J., & Mehdi, M. S. (2014). Study of morphology and Zeta Potential analyzer for the Silver Nanoparticles. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 5(7), 381–387.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., ... Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2012.06.004>
- Hamouda, T., & Baker, J. R. (2000). Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric gram-negative bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 397–403. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01127.x>
- Han, J. H. (2014). Edible Films and Coatings: A Review. In *Innovations in Food Packaging: Second Edition* (pp. 213–255). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
- Hansen, S. F. (2013). The European Union's chemical legislation needs revision. *Nature Nanotechnology* 2013 8:5, 8(5), 305–306. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.72>
- Hansen, S. F. (2017). React now regarding nanomaterial regulation. *Nature Nanotechnology*, 12(8), 714–716. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.163>
- Hashem AM, Abuzeid H, Kaus M, et al (2018) Green synthesis of nanosized manganese dioxide as positive electrode for lithium-ion batteries using lemon juice and citrus peel. *Electrochim Acta* 262:74–81. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.01.024>
- Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M., Najafi, M. A., Adun, P., & Ostadrahimid, A. (2019). Kinetic release study of zinc from polylactic acid based nanocomposite into food simulants. *Polymer Testing*, 76(November 2018), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.03.040>
- Hu, X., Takada, N., Machmudah, S., Wahyudiono, Kanda, H., & Goto, M. (2020).

- Ultrasonic-Enhanced Fabrication of Metal Nanoparticles by Laser Ablation in Liquid. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 59(16), 7512–7519. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b06384>
- Ishigaki, T., Sugano, W., Nakanishi, A., Tateda, M., Ike, M., & Fujita, M. (2004). The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors. *Chemosphere*, 54(3), 225–233. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00750-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00750-1)
- Jafarzadeh, S., Jafari, S. M., Salehabadi, A., Nafchi, A. M., Seeta, U., Kumar, U., & Khalil, H. P. S. A. (2020). *Biodegradable green packaging with antimicrobial functions based on the bioactive compounds from tropical plants and their by-products*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.017>
- Jahan I, Erci F, Isildak I (2021). Facile microwave-mediated green synthesis of non-toxic copper nanoparticles using Citrus sinensis aqueous fruit extract and their antibacterial potentials. *J Drug Deliv Sci Technol* 61:102172. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102172>
- Jayachandran, A., Aswathy, T., & Nair, A. (2021). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using Cayratia pedata leaf extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26.
- Ji, N., Liu, C., Zhang, S., Xiong, L., & Sun, Q. (2016). Elaboration and characterization of corn starch films incorporating silver nanoparticles obtained using short glucan chains. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.065>
- Kahrilas, G. A., Wally, L. M., Fredrick, S. J., Hiskey, M., Prieto, A. L., & Owens, J. E. (2014). Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Orange Peel Extract. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(3), 367–376. <https://doi.org/10.1021/sc4003664>
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014a). Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 258–266. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.05.011>
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014b). Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. *Food Hydrocolloids*, 35, 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.08.011>
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014c). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148(1), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.047>
- Karel, M., & Lund, D. (2003). Physical Principles of Food Preservation : Revised and Expanded. *Physical Principles of Food Preservation*. <https://doi.org/10.1201/9780203911792>

- Kashale AA, Gattu KP, Ghule K, et al (2016). Biomediated green synthesis of TiO₂ nanoparticles for lithium ion battery application. *Compos Part B Eng* 99:297–304. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2016.06.015>
- Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M., & Jones, A. (2010). High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1927), 4439–4451. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0175>
- Katerinopoulou, K., Giannakas, A., & Barkoula, N. (2018). Preparation , Characterization , and Biodegradability Assessment of Maize Starch- (PVOH)/ Clay Nanocomposite Films. *Starch - Stärke*, 1800076, 1–8. <https://doi.org/10.1002/star.201800076>
- Kathiraven, T., Sundaramanickam, A., Shanmugam, N., & Balasubramanian, T. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using marine algae *Caulerpa racemosa* and their antibacterial activity against some human pathogens. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 5(4), 499–504. <https://doi.org/10.1007/s13204-014-0341-2>
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., & Srinivasan, K. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(3), 594–598. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.040>
- Kazakevich, P. V., Simakin, A. V., Voronov, V. V., & Shafeev, G. A. (2006). Laser induced synthesis of nanoparticles in liquids. *Applied Surface Science*, 252(13 SPEC. ISS.), 4373–4380. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2005.06.059>
- Kelly, N. P., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2019). Strategies for enrichment and purification of polyphenols from fruit-based materials. *Trends in Food Science and Technology*, 83(November 2018), 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.010>
- Kerker, M. (1985). The optics of colloidal silver: something old and something new. *Journal of Colloid And Interface Science*, 105(2), 297–314. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(85\)90304-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(85)90304-2)
- Kettler, K., Giannakou, C., de Jong, W. H., Hendriks, A. J., & Krystek, P. (2016). Uptake of silver nanoparticles by monocytic THP-1 cells depends on particle size and presence of serum proteins. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(9), 286. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3595-7>
- Khan, Z., Singh, T., Hussain, J. I., Obaid, A. Y., Al-Thabaiti, S. A., & El-Mossalamy, E. H. (2013). Starch-directed green synthesis, characterization and morphology of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 578–584. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.057>
- Khan, Z., Singh, T., Ijaz, J., Yousif, A., Al-thabaiti, S. A., & El-mossalamy, E. H. (2013). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Starch-directed green synthesis , characterization and morphology of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 578–584. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.057>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... Cho, M. H. (2007).

- Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8), 1482–1484. <https://doi.org/7490> [pii]
- Kim, M. H., Kim, T. H., Ko, J. A., Ko, S., Oh, J. M., & Park, H. J. (2019). Kinetic and thermodynamic studies of silver migration from nanocomposites. *Journal of Food Engineering*, 243(September 2018), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.028>
- Kizil, R., Irudayaraj, J., & Seetharaman, K. (2002). Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3912–3918. <https://doi.org/10.1021/jf011652p>
- Kulkarni, S. K. (2015). Nanotechnology: Principles and Practices. In *Nanotechnology: Principles and Practices* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-09171-6>
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., & Pathak, R. N. (2014). Sonochemical synthesis of silver nanoparticles using starch: A comparison. *Bioinorganic Chemistry and Applications, 2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/784268>
- Kumari, P., & Meena, A. (2020). Green synthesis of gold nanoparticles from Lawsoniainermis and its catalytic activities following the Langmuir-Hinshelwood mechanism. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 606, 125447. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2020.125447>
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Orbell, J. D., Buddhadasa, S., & Bigger, S. W. (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(4), 411–430. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12139>
- Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtepan-Turrent, L., & Singh, D. K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-30>
- Leites Luchese, C., Menegotto Frick, P., & Tessarol Cristina, I. (2021). Influence of the incorporation form of waste from the production of orange juice in the properties of cassava starch-based films. *Food Hydrocolloids*, 117, 106730. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106730>
- Liang, J., Wang, J., Li, S., Xu, L., Wang, R., Chen, R., & Sun, Y. (2019). The size-controllable preparation of chitosan/silver nanoparticle composite microsphere and its antimicrobial performance. *Carbohydrate Polymers*, 220, 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.05.048>
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019a). Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>

- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019b). Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Liu, Wei, Wu, Y., Wang, C., Li, H. C., Wang, T., Liao, C. Y., ... Jiang, G. B. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology*, 4(3), 319–330. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.483745>
- Liu, Wenyong, Wang, Z., Liu, J., Dai, B., Hu, S., Hong, R., ... Zeng, G. (2020). *Preparation, reinforcement and properties of thermoplastic starch film by film blowing*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106006>
- Liu, Z., & Han, J. H. (2005). Film-forming Characteristics of Starches. *JFS E: Food Engineering and Physical Properties*, 70(1), 31–36.
- López, O. V. (2011). *DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE ENVASES BIODEGRADABLES A PARTIR DE ALMIDÓN*. Universidad Nacional de La Plata.
- López Olivia V., Castillo Luciana A., García M. Alejandra, Villar Marcelo A., & Barbosa Silvia E. (2015). Food packaging bags based on thermoplastic corn starch reinforced with talc nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 43, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.021>
- López, O. V., García, M. A., & Zaritzky, N. E. (2008). Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.023>
- López, O. V., Giannuzzi, L., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2013). Potassium sorbate controlled release from corn starch films. *Materials Science and Engineering C*, 33(3), 1583–1591. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.064>
- López, O. V., Lecot, C. J., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2011). Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.029>
- López, O. V., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2010). Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.041>
- Luchese, C. L., Spada, J. C., & Tessaro, I. C. (2017). StaLuchese, C. L., Spada, J. C., & Tessaro, I. C. (2017). Starch content affects physicochemical properties of corn and cassava starch-based films. *Industrial Crops and Products*, 109(May), 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.020>rch content . *Industrial Crops and Products*, 109(May), 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.020>
- Ludueña, L., Vázquez, A., & Alvarez, V. (2012). Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.064>
- Lunov, O., Syrovets, T., Loos, C., Beil, J., Delacher, M., Tron, K., ... Simmet, T. (2011).

- Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano*, 5(3), 1657–1669. <https://doi.org/10.1021/nn2000756>
- Mafuné, Fumitaka, Kohno, J. Y., Takeda, Y., & Kondow, T. (2003). Formation of stable platinum nanoparticles by laser ablation in water. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(18), 4218–4223. <https://doi.org/10.1021/jp021580k>
- Mafuné, Fumitaka, Kohno, J. Y., Takeda, Y., Kondow, T., & Sawabe, H. (2000). Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(35), 8336–8337. <https://doi.org/10.1021/jp001803b>
- Mafuné, Furnitaka, Kohno, J. Y., Takeda, Y., Kondow, T., & Sawabe, H. (2000). Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(39), 9111–9117. <https://doi.org/10.1021/jp001336y>
- Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M. H., & Karim, A. A. (2007). Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch-alginate edible film containing lemongrass oil. *Journal of Food Science*, 72(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00427.x>
- Malathi, A. N., & Singh, A. K. (2019). Antimicrobial activity of rice starch based film reinforced with titanium dioxide (TiO₂) Nanoparticles. *Agricultural Research Journal*, 56(1), 111. <https://doi.org/10.5958/2395-146x.2019.00017.6>
- Manoj D, Saravanan R, Santhanalakshmi J, et al (2018). Towards green synthesis of monodisperse Cu nanoparticles: An efficient and high sensitive electrochemical nitrite sensor. *Sensors Actuators, B Chem* 266:873–882. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.141>
- Marambio-Jones, Catalina Hoek, E. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 21. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
- Marchiol, L., Mattiello, A., Pošćić, F., Giordano, C., & Musetti, R. (2014). In vivo synthesis of nanomaterials in plants: Location of silver nanoparticles and plant metabolism. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-101>
- Marín, F. R., Martínez, M., Urbesalgo, T., Castillo, S., & Frutos, M. J. (2002). Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chemistry*, 78(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00102-4)
- Martina, I., Wiesinger, R., & Schreiner, M. (2012). Micro-Raman Characterisation of Silver Corrosion Products: Instrumental Set Up and Reference. *E-Preservation Science*, 9, 1–8.
- Martínez-Abad, A., Lagarón, J. M., & Ocio, M. J. (2014). Antimicrobial beeswax coated polylactide films with silver control release capacity. *International Journal of Food*

Microbiology, 174, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.028>

- Masala, O., & Seshadri, R. (2004). Synthesis Routes for Large Volumes of Nanoparticles. *Annual Review of Materials Research*, 34(1), 41–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.34.052803.090949>
- McClements, D. J. (2014). Nanoparticle- and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds. *Nanoparticle- and Microparticle-Based Delivery Systems: Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds*, 1–524. <https://doi.org/10.1201/B17280>
- Menzel, C., Olsson, E., Plivelic, T. S., Andersson, R., Johansson, C., Kuktaite, R., ... Koch, K. (2013). Molecular structure of citric acid cross-linked starch films. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.044>
- Metak, A. M., Nabhani, F., & Connolly, S. N. (2015). Migration of engineered nanoparticles from packaging into food products. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.001>
- Mihindukulasuriya, S. D. F., & Lim, L. T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 40(2), 149–167. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.009>
- Mirjalili, F., & Yassini Ardekani, A. (2017). Preparation and characterization of starch film accompanied with ZnO nanoparticles. *Journal of Food Process Engineering*, 40(6). <https://doi.org/10.1111/jfpe.12561>
- Missoum, K., Belgacem, M., Materials, J. B.-, & 2013, undefined. (2013). Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. *Mdpi.Com*, 6, 1745–1766. <https://doi.org/10.3390/ma6051745>
- Mohammadi Nafchi, A., Cheng, L. H., & Karim, A. A. (2011). Effects of plasticizers on thermal properties and heat sealability of sago starch films. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.005>
- Mohammadi SZ, Lashkari B, Khosravan A (2021) Green synthesis of Co3O4 nanoparticles by using walnut green skin extract as a reducing agent by using response surface methodology. *Surfaces and Interfaces* 23:100970. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.100970>
- Mohanasrinivasan V, Subathra Devi C, Mehra A, et al (2018). Biosynthesis of MgO Nanoparticles Using Lactobacillus Sp. and its Activity Against Human Leukemia Cell Lines HL-60. *Bionanoscience* 8:249–253. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0480-5>
- Mohapatra, B., Kaintura, R., Singh, J., Kuriakose, S., & Mohapatra, S. (2015). Biosynthesis Of High Concentration, Stable Aqueous Dispersions Of Silver Nanoparticles Using Citrus Limon extract. *Advanced Materials Letters*, 6(3), 228–234. <https://doi.org/10.5185/amlett.2015.5731>
- Monroy, Y., Rivero, S., García, M. A., & García, M. A. (2017). Functional Jelly Beans Based On Hydrocolloids And Citrus Cremogenates. *Journal of Multidisciplinary*

- Morales, J., Morán, J., Quintana, M., & Estrada, W. (2009). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA POR LA RUTA Sol-Gel A PARTIR DE NITRATO DE PLATA SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES BY Sol-Gel ROUTE FROM SILVER NITRATE. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 75(2), 177–184.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Muizniece-Brasava, S., Dukalska, L., Murniece, I., Dabina-Bicka, I., Kozlinskis, E., Sarvi, S., ... Silvjane, A. (2012). Active Packaging Influence on Shelf Life Extension of Sliced Wheat Bread. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 6(7), 480–486. Retrieved from <http://publications.waset.org/7005/active-packaging-influence-on-shelf-life-extension-of-sliced-wheat-bread>
- Muñetón Arboleda, D. (2018). *Caracterización de suspensiones coloidales de nanopartículas metálicas sintetizadas por ablación láser de pulsos ultracortos* (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/68123>
- Nabi G, Ain Q-U-, Tahir MB, et al (2020). Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using lemon peel extract: their optical and photocatalytic properties. *Int J Environ Anal Chem* 00:1–9. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1722816>
- Nafchi, A. M., Nassiri, R., Sheibani, S., Ariffin, F., & Karim, A. A. (2013). Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.055>
- Nasrollahzadeh, M., Mahmoudi-Gom Yek, S., Motahharifar, N., & Ghafari Gorab, M. (2019). Recent Developments in the Plant-Mediated Green Synthesis of Ag-Based Nanoparticles for Environmental and Catalytic Applications. *Chemical Record*, Vol. 19, pp. 2436–2479. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800202>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, M. M., Babaei, F., & Maham, M. (2015). Euphorbia helioscopia Linn as a green source for synthesis of silver nanoparticles and their optical and catalytic properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 450, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.033>
- Nasseri, R., & Mohammadi, N. (2014). Starch-based nanocomposites: A comparative performance study of cellulose whiskers and starch nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 106(1), 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.029>
- Nidhin, M., Sreeram, K. J., & Nair, B. U. (2012). Green synthesis of rock salt CoO nanoparticles for coating applications by complexation and surface passivation with starch. *Chemical Engineering Journal*, 185–186, 352–357. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2011.11.104>
- Nielsen, S. S. (2017). *Food Analysis Laboratory Manual* (3rd ed.). https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_14

- Noonan, G. O., Whelton, A. J., Carlander, D., & Duncan, T. V. (2014). Measurement methods to evaluate engineered nanomaterial release from food contact materials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 13, pp. 679–692. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12079>
- Nordin, N., Othman, S. H., Rashid, S. A., & Basha, R. K. (2020). Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids*, 106(March), 105884. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105884>
- Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Rezaei Mokarram, R., & Hashemi, M. (2017). Novel active packaging based on carboxymethyl cellulose-chitosan-ZnO NPs nanocomposite for increasing the shelf life of bread. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.01.010>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005, July). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 113, pp. 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Okada, Y., & Kokhanovsky, A. A. (2009). Light scattering and absorption by densely packed groups of spherical particles. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 110(11), 902–917. <https://doi.org/10.1016/J.JQSRT.2008.12.007>
- Oliveira de Moraes, J., Scheibe, A. S., Augusto, B., Carciofi, M., & Laurindo, J. B. (2015). Conductive drying of starch-fiber films prepared by tape casting: Drying rates and film properties. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.038>
- Olsson, E., Menzel, C., Johansson, C., Andersson, R., Koch, K., & Jönström, L. (2013). The effect of pH on hydrolysis, cross-linking and barrier properties of starch barriers containing citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 98(2), 1505–1513. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.040>
- Oluwafemi, O. S., Vuyelwa, N., Scriba, M., & Songca, S. P. (2013). Green controlled synthesis of monodispersed, stable and smaller sized starch-capped silver nanoparticles. *Materials Letters*, 106, 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.05.001>
- Ortega, F., Arce, V. B., & Garcia, M. A. (2021). Nanocomposite starch-based films containing silver nanoparticles synthesized with lemon juice as reducing and stabilizing agent. *Carbohydrate Polymers*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117208>
- Ortega, F., García, M. A., & Arce, V. B. (2019). Nanocomposite films with silver nanoparticles synthesized in situ: Effect of corn starch content. *Food Hydrocolloids*, 97. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105200>
- Ortega, F., Giannuzzi, L., Arce, V. B., & García, M. A. (2017). Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 70, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.036>

- Ortega, F., Versino, F., López, O. V., & García, M. A. (2021). Biobased composites from agro - industrial wastes and by - products. *Emergent Materials*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s42247-021-00319-x>
- Padmanabhan, S. C., Cruz-Romero, M. C., Kerry, J. P., & Morris, M. A. (2018). Food packaging: Surface engineering and commercialization. In *Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00011-5>
- Palem, R. R., Ganesh, S. D., Kronekova, Z., Sláviková, M., Saha, N., & Saha, P. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles and biopolymer nanocomposites: A comparative study on physico-chemical, antimicrobial and anticancer activity. *Bulletin of Materials Science*, 41(2). <https://doi.org/10.1007/s12034-018-1567-5>
- Panáček, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolár, M., Vecerová, R., Pizúrovia, N., ... Zboril, R. (2006). Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B*, 110, 16248–16253. <https://doi.org/10.1021/jp063826h>
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., & Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1–2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044>
- Park, M. V. D. Z., Neigh, A. M., Vermeulen, J. P., de la Fonteyne, L. J. J., Verharen, H. W., Briedé, J. J., ... de Jong, W. H. (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(36), 9810–9817. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.08.085>
- Passaretti, M. G., Ninago, M. D., Paulo, C. I., Petit, H. A., Irassar, E. F., Vega, D. A., ... López, O. V. (2019). Biocomposites based on thermoplastic starch and granite sand quarry waste. *Journal of Renewable Materials*, 7(4), 393–402. <https://doi.org/10.32604/JRM.2019.04281>
- Peng, H., Yuan, L., Zhang, J., Wu, X., Liu, Y., Liu, Y., & Ruan, R. (2018). Adsorption of AgNO₃ onto bamboo hemicelluloses in aqueous medium. *Carbohydrate Polymers*, 188, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.051>
- Pérez, S., & Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Staerke*, 62(8), 389–420. <https://doi.org/10.1002/star.201000013>
- Petrus, D. R., & Dougherty, M. H. (1973). Spectral Characteristics of Three Varieties of Florida Orange Juice. *Journal of Food Science*, 38(4), 659–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1973.tb02838.x>
- Phumying S, Labuayai S, Thomas C, et al (2013). Aloe vera plant-extracted solution hydrothermal synthesis and magnetic properties of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Appl Phys A Mater Sci Process* 111:1187–1193. <https://doi.org/10.1007/s00339-012-7340-5>

- Picó, Y. (2018). Safety assessment and migration tests. In *Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues* (pp. 249–275). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00009-7>
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1261–1269. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.024>
- Pinto, V. V., Ferreira, M. J., Silva, R., Santos, H. A., Silva, F., & Pereira, C. M. (2010). Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 364(1–3), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.04.015>
- Poças, F., & Franz, R. (2018). Overview on european regulatory issues, legislation, and EFSA evaluations of nanomaterials. *Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues*, 277–300. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00010-3>
- Polat, S., Fenercioğlu, H., & Güçlü, M. (2018). Effects of metal nanoparticles on the physical and migration properties of low density polyethylene films. *Journal of Food Engineering*, 229, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.004>
- Polte, J., Tuae, X., Wuithschick, M., Fischer, A., Thuenemann, A. F., Rademann, K., ... Emmerling, F. (2012). Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: Analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. *ACS Nano*, 6(7), 5791–5802. <https://doi.org/10.1021/nn301724z>
- Popoff, M. R. (1987). Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infection and Immunity*, 55(1), 35–43. <https://doi.org/10.1128/iai.55.1.35-43.1987>
- Pradeep, T., & Anshup. (2009). Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. *Thin Solid Films*, 517(24), 6441–6478. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.03.195>
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 859–865. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.014>
- Prathna, T. C., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M., & Mukherjee, A. (2011). Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by Citrus limon (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.08.036>
- Prathna, T. C., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2014). Sunlight irradiation induced green synthesis of stable silver nanoparticles using citrus limon extract. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 84(1), 65–70. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0193-7>

- Raeisi M, Alijani HQ, Peydayesh M, et al (2021). Magnetic cobalt oxide nanosheets: green synthesis and in vitro cytotoxicity. *Bioprocess Biosyst Eng* 44:1423–1432. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02518-6>
- Raghavendra, G. M., Jung, J., kim, D., & Seo, J. (2016). Microwave assisted antibacterial chitosan-silver nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.026>
- Raghavendra, G. M., Jung, J., Kim, D., & Seo, J. (2016). Step-reduced synthesis of starch-silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 126–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.057>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Rajakumar G, Rahuman AA, Jayaseelan C, et al (2014). Solanum trilobatum extract-mediated synthesis of titanium dioxide nanoparticles to control *Pediculus humanus capitis*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Anopheles subpictus*. *Parasitol Res* 113:469–479. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3676-9>
- Rather, R. A., Sarwara, R. K., Das, N., & Pal, B. (2018). Impact of reducing and capping agents on carbohydrates for the growth of Ag and Cu nanostructures and their antibacterial activities. *Particuology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2018.01.004>
- Rauwel, P., Küünal, S., Ferdov, S., & Rauwel, E. (2015). A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/682749>
- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely “ Green ” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles Completely “ Green ” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940–13941. <https://doi.org/10.1021/ja029267j>
- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2006). A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles. *Green Chemistry*, 8(1), 34. <https://doi.org/10.1039/b512540e>
- Reddy, N., & Yang, Y. (2010). Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 118(3), 702–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.050>
- Ren, Y. yu, Yang, H., Wang, T., & Wang, C. (2016). Green synthesis and antimicrobial activity of monodisperse silver nanoparticles synthesized using Ginkgo Biloba leaf extract. *Physics Letters, Section A: General, Atomic and Solid State Physics*, 380(45), 3773–3777. <https://doi.org/10.1016/j.physleta.2016.09.029>
- Reyes-Álvarez, C. A., & Lanari, M. C. (2020). Storage stability of freeze-dried arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) powders. Implications of carrier type and glass transition. *LWT*, 118, 108842. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108842>
- Rhim, J.-W., Hong, S. I., Park, H.-M., & Perry K. W. NG. (2006). Preparation and

Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5814–5822.

- Rhim, J. W., Wang, L. F., & Hong, S. I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.002>
- Rhim, Jong Whan, Wang, L. F., Lee, Y., & Hong, S. I. (2014). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films of agar and silver nanoparticles: Laser ablation method. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.075>
- Riar, C. S. (2016). Studies on Influence of Chemical Modification, Plasticizer and Starch Concentration on Some Characteristics of Biodegradable Film. *Materials Science Forum*, 842, 129–156. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.842.129>
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90035-6)
- Rivera-Chaverra MJ, Restrepo-Parra E, Acosta-Medina CD, et al (2020). Synthesis of oxide iron nanoparticles using laser ablation for possible hyperthermia applications. *Nanomaterials* 10:1–13. <https://doi.org/10.3390/nano10112099>
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.021>
- Rolim, W. R., Pelegrino, M. T., de Araújo Lima, B., Ferraz, L. S., Costa, F. N., Bernardes, J. S., ... Seabra, A. B. (2019). Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*, 463, 66–74. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2018.08.203>
- Romero-Bastida, C. A., Chávez Gutiérrez, M., Bello-Pérez, L. A., Abarca-Ramírez, E., Velázquez, G., & Mendez-Montealvo, G. (2018). Rheological properties of nanocomposite-forming solutions and film based on montmorillonite and corn starch with different amylose content. *Carbohydrate Polymers*, 188, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.089>
- Rouhi, J., Mahmud, S., Naderi, N., Raymond Ooi, C. H., & Mahmood, M. R. (2013). Physical properties of fish gelatin-based bio-nanocomposite films incorporated with ZnO nanorods. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-364>
- Sadegh-Hassani, F., & Mohammadi Nafchi, A. (2014). Preparation and characterization of bionanocomposite films based on potato starch/halloysite nanoclay. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.009>
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have

- potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.008>
- Sánchez-García, L., Bolea, E., Laborda, F., Cubel, C., Ferrer, P., Gianolio, D., ... Castillo, J. R. (2016). Size determination and quantification of engineered cerium oxide nanoparticles by flow field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1438, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.036>
- Sandhu, K. S., Sharma, L., Kaur, M., & Kaur, R. (2020). Physical, structural and thermal properties of composite edible films prepared from pearl millet starch and carrageenan gum: Process optimization using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 704–713. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.111>
- Santillán, J. M. J., Scaffardi, L. B., & Schinca, D. C. (2011). Quantitative optical extinction-based parametric method for sizing a single core-shell Ag-Ag₂O nanoparticle. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(10). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/44/10/105104>
- Sanyang, M. L., Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., & Jumaidin, R. (2017). Sugar palm starch-based composites for packaging applications. In *Bionanocomposites for Packaging Applications* (pp. 125–147). https://doi.org/10.1007/978-3-319-67319-6_7
- Sarantópoulos, C. I. G. L., de Oliveira, L. M., Padula, M., Coltro, L., Vercelino Alves, R. M., & Correa Garcia, E. E. (2002). *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades*. Campinas, Brasil: CETEA/ITAL.
- Sarwar, M. S., Niazi, M. B. K., Jahan, Z., Ahmad, T., & Hussain, A. (2018). Preparation and characterization of PVA/nanocellulose/Ag nanocomposite films for antimicrobial food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 184(July 2017), 453–464. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.068>
- Sarwar N, Humayoun U Bin, Kumar M, et al (2021) Citric acid mediated green synthesis of copper nanoparticles using cinnamon bark extract and its multifaceted applications. *J Clean Prod* 292:125974. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clepro.2021.125974>
- Scaramuzza, S., Zerbetto, M., & Amendola, V. (2016). Synthesis of gold nanoparticles in liquid environment by laser ablation with geometrically confined configurations: Insights to improve size control and productivity. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(17), 9453–9463. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00161>
- Schmid, G. (2011). *Nanopartilces: From Theory to Application* (2nd ed.). Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=U25c9bh8GI4C&oi=fnd&pg=PT6&dq=Schmid,+G.,+Nanoparticles:+from+theory+to+application.+John+Wiley+%26+Sons:+2011&ots=na7WkE0IPz&sig=vgwtQ-KOfFXPBnOsPDx5BErzDY>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012a). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012b). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seligra, P. G., Medina Jaramillo, C., Famá, L., & Goyanes, S. (2016). Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch-glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*, 138, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.041>
- Selvakumar, P. M., Antonyraj, C. A., Babu, R., Dakhsinamurthy, A., Manikandan, N., & Palanivel, A. (2016). Green Synthesis and Antimicrobial Activity of Monodispersed Silver Nanoparticles Synthesized Using Lemon Extract. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 46(2), 291–294. <https://doi.org/10.1080/15533174.2014.971810>
- Senthil, T., Kumar, M., Rajini, N., Reddy, K. O., Rajulu, A. V., Siengchin, S., & Ayrilmis, N. (2018). *All-cellulose composite films with cellulose matrix and Napier grass cellulose fibril fillers*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.167>
- Shadak Alee, K., Kuladeep, R., & Narayana Rao, D. (2013). In-situ investigation of the formation of silver nanoparticles in polyvinyl alcohol through micro-Raman spectroscopy. *Optics Communications*, 293, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2012.12.004>
- Shameli, K., Ahmad, M. Bin, Md Zin Wan Yunus, W., Ibrahim, N. A., Rahman, R. A., Jokar, M., & Darroudi, M. (2010). Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: Preparation, characterization, and antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 573–579.
- Sharma, J., Srivastava, P., Singh, G., et al. (2015). Green synthesis of Co₃O₄ nanoparticles and their applications in thermal decomposition of ammonium perchlorate and dye-sensitized solar cells. *Mater Sci Eng B Solid-State Mater Adv Technol* 193:181–188. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2014.12.012>
- Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343, 128403. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128403>
- Shen, M.-H., Zhou, X.-X., Yang, X.-Y., Chao, J.-B., Liu, R., & Liu, J.-F. (2015). Exposure Medium: Key in Identifying Free Ag⁺ as the Exclusive Species of Silver Nanoparticles with Acute Toxicity to *Daphnia magna*. *Scientific Reports*, 5(1), 9674. <https://doi.org/10.1038/srep09674>
- Shi, R., Bi, J., Zhang, Z., Zhu, A., Chen, D., Zhou, X., ... Tian, W. (2008). The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.045>
- Sibiya, P. N., Xaba, T., & Moloto, M. J. (2016). Green synthetic approach for starch

- capped silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Pure and Applied Chemistry*, 88(1–2), 61–69. <https://doi.org/10.1515/pac-2015-0704>
- Singh, S., Bharti, A., & Meena, V. K. (2014). Structural, thermal, zeta potential and electrical properties of disaccharide reduced silver nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 25(9), 3747–3752. <https://doi.org/10.1007/s10854-014-2085-x>
- Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. . F., Ávalos-Borja, M. ., Castillón-Barraza, F. F., & Posada-Amarillas, A. (2005). Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 27((1-2)), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2004.10.014>
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- Song, Y., Guan, R., Lyu, F., Kang, T., Wu, Y., & Chen, X. (2014). In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 769, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.08.001>
- Souza, V. G. L., & Fernando, A. L. (2016). Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food-A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.04.001>
- Stasi, E., Giuri, A., Ferrari, F., Armenise, V., Colella, S., Listorti, A., ... Corcione, C. E. (2020). Biodegradable carbon-based ashes/maize starch composite films for agricultural applications. *Polymers*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/polym12030524>
- Störmer, A., Bott, J., Kemmer, D., & Franz, R. (2017). Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.011>
- Su, J. F., Huang, Z., Zhao, Y. H., Yuan, X. Y., Wang, X. Y., & Li, M. (2010). Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol)/glycerol blend films. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.010>
- Sujitha, M. V., & Kannan, S. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (Citrus limon, Citrus reticulata and Citrus sinensis) aqueous extract and its characterization. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.042>
- Suresh J, Pradheesh G, Alexramani V, et al (2018). Green synthesis and characterization of hexagonal shaped MgO nanoparticles using insulin plant (Costus pictus D. Don) leave extract and its antimicrobial as well as anticancer activity. *Adv Powder Technol* 29:1685–1694. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2018.04.003>
- Swarnkar RK, Singh SC, Gopal R (2011). Effect of aging on copper nanoparticles

- synthesized by pulsed laser ablation in water: Structural and optical characterizations. *Bull Mater Sci* 34:1363–1369. <https://doi.org/10.1007/s12034-011-0329-4>
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch - Composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- Varghese, S. A., Siengchin, S., & Parameswaranpillai, J. (2020). Essential oils as antimicrobial agents in biopolymer-based food packaging - A comprehensive review. *Food Bioscience*, 38, 100785. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100785>
- Veraart, R., & Rijk, R. (Eds.). (2010). *Global Legislation for Food Packaging Materials* (WILEY-VCH). Weinheim, Germany.
- Versino, F. (2017). *MATERIALES COMPUESTOS BIODEGRADABLES CON USOS AGRONÓMICOS A PARTIR DE RAÍCES TUBEROSAS*. Retrieved from <http://gip.uniovi.es/docume/TClaudia.pdf>
- Vigneshwaran, N., Nachane, R. P., Balasubramanya, R. H., & Varadarajan, P. V. (2006). A novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate Research*, 341(12), 2012–2018. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.04.042>
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19(12), 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.003>
- Wang, K., Wang, W., Ye, R., Liu, A., Xiao, J., Liu, Y., & Zhao, Y. (2017). Mechanical properties and solubility in water of corn starch-collagen composite films: Effect of starch type and concentrations. *Food Chemistry*, 216, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.048>
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568–585. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143>
- Wang, W., Yu, Z., Alsammarraie, F. K., Kong, F., Lin, M., & Mustapha, A. (2020). Properties and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol-modified bacterial nanocellulose packaging films incorporated with silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 100(June 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105411>
- Wang Z (2013). Iron complex nanoparticles synthesized by eucalyptus leaves. *ACS Sustain Chem Eng* 1:1551–1554. <https://doi.org/10.1021/sc400174a>
- Westerband, E. I., & Hicks, A. L. (2018). Life cycle impact of nanosilver polymer-food storage containers as a case study informed by literature review. *Environmental*

- Science: Nano*, 5(4), 933–945. <https://doi.org/10.1039/c7en01043e>
- Wu, Z., Yang, S., & Wu, W. (2016). Shape control of inorganic nanoparticles from solution. *Nanoscale*, 8(3), 1237–1259. <https://doi.org/10.1039/c5nr07681a>
- Xi, W., Lu, J., Qun, J., & Jiao, B. (2017). Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1108–1118. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2544-5>
- Xu, Y., Rehmani, N., Alsubaie, L., Kim, C., Sismour, E., & Scales, A. (2018). Tapioca starch active nanocomposite films and their antimicrobial effectiveness on ready-to-eat chicken meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 16(February), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.02.006>
- Yao, B. D., Chan, Y. F., & Wang, N. (2002). Formation of ZnO nanostructures by a simple way of thermal evaporation. *Applied Physics Letters*, 81(4), 757–759. <https://doi.org/10.1063/1.1495878>
- Yildirim, S., & Röcker, B. (2018). Active packaging. In *Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues* (pp. 173–202). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51271-8.00007-3>
- Yin, Y., Li, Z. Y., Zhong, Z., Gates, B., Xia, Y., & Venkateswaran, S. (2002). Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *Journal of Materials Chemistry*, 12(3), 522–527. <https://doi.org/10.1039/b107469e>
- Yin, Y., Rioux, R. M., Erdonmez, C. K., Hughes, S., Somorjai, G. A., & Alivisatos, A. P. (2004). Formation of Hollow Nanocrystals Through the Nanoscale Kirkendall Effect Downloaded from. In *SCIENCE* (Vol. 304). Retrieved from www.sciencemag.org<http://science.sciencemag.org/>
- Yoksan, R., & Chirachanchai, S. (2010). Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering C*, 30(6), 891–897. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.04.004>
- Youssef, A. M., & El-Sayed, S. M. (2018). Bionanocomposites materials for food packaging applications: Concepts and future outlook. *Carbohydrate Polymers*, 193, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.088>
- Yu, Z., Wang, W., Kong, F., Lin, M., & Mustapha, A. (2019). Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 887–894. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.084>
- Zamiri, R., Azmi, B. Z., Ahangar, H. A., Zamiri, G., Husin, M. S., & Wahab, Z. A. (2012). Preparation and characterization of silver nanoparticles in natural polymers using laser ablation. *Bulletin of Materials Science*, 35(5), 727–731. <https://doi.org/10.1007/s12034-012-0360-0>

- Zamiri, R., Zakaria, A., Ahangar, H. A., Darroudi, M., Zak, A. K., & Drummen, G. P. C. (2012). Aqueous starch as a stabilizer in zinc oxide nanoparticle synthesis via laser ablation. *Journal of Alloys and Compounds*, *516*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2011.11.118>
- Zhang, D., Gökce, B., & Barcikowski, S. (2017). Laser Synthesis and Processing of Colloids: Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, *117*(5), 3990–4103. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00468>
- Zhang, S., Gao, H., nano, G. B.-A., & 2015, undefined. (2021). Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Publications*, *03*(9), 23. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>
- Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., & Chen, C. (2014, March). Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Medical Journal*, Vol. 55, pp. 283–291. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.2.283>
- Zhang, W., & Jiang, W. (2020). Antioxidant and antibacterial chitosan film with tea polyphenols-mediated green synthesis silver nanoparticle via a novel one-pot method. *International Journal of Biological Macromolecules*, (155), 1252–1261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.093>
- Zhang, Yachuan, & Han, J. H. (2006). Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, *71*(6), 253–261. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00075.x>
- Zhang, Yongwen, 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*(2), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.05.063>
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014). The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate Polymers*, *109*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.018>