

**OBTENCIÓN DE PELÍCULAS CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS A PARTIR
DE ALMIDÓN Y NANOPARTÍCULAS DE ZnO: EFECTO SOBRE *Botrytis
cinerea* y *Aspergillus niger*.**



LUIS ALEJANDRO ERAZO CASTILLO

**Trabajo de grado en la modalidad de investigación para optar al
Título de Ingeniero Agroindustrial**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2017**

**OBTENCIÓN DE PELÍCULAS CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS A PARTIR
DE ALMIDÓN Y NANOPARTÍCULAS DE ZnO: EFECTO SOBRE *Botrytis
cinerea* y *Aspergillus niger*.**



LUIS ALEJANDRO ERAZO CASTILLO

**Trabajo de grado en la modalidad de investigación para optar al
Título de Ingeniero Agroindustrial**

Directores

Mg. Sc. SILVIO ANDRÉS MOSQUERA SÁNCHEZ

D.Sc. JORGE ENRIQUE RODRÍGUEZ PÁEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POPAYÁN
2017**

Nota de aceptación:

Los directores y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por su autor y lo encuentran satisfactorio

Silvio Andrés Mosquera Sánchez
Director

Jorge Enrique Rodríguez Páez
Director

Sandra Patricia Paz Peña
Presidente del Jurado

Jazmín Calvache Muñoz
Jurado

Popayán, Febrero 24 de 2017

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	16
2. MARCO REFERENCIAL	18
2.1. LOCALIZACIÓN	18
2.2. MARCO TEÓRICO	18
2.2.1. Producción hortofrutícola en Colombia: problemas y pérdidas poscosecha	18
2.2.2. Problemas y pérdidas poscosecha causados por <i>Botrystis cinerea</i> y <i>Aspergillus niger</i>	20
2.2.3. Métodos de control fúngico en frutas y hortalizas	21
2.2.4. Empaques activos con funcionalidad antifúngica	21
2.2.4.1. Obtención de empaques de origen natural	23
2.2.4.2. Uso de la nanotecnología para la obtención de empaques antifúngicos	24
2.2.4.3. Procesos para la obtención de películas de almidón de yuca	25
2.3. MARCO HISTÓRICO	26

	pág.
3. METODOLOGÍA	30
3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTICULAS CON BASE EN ZnO	30
3.1.1. Reactivos	30
3.1.2. Materiales y equipos	31
3.1.3. Síntesis de ZnO-NP por rutas químicas	31
3.1.3.1. Obtención de ZnO-NP: morfología esférica	32
3.1.3.2. Obtención de ZnO-NP: morfología acicular	33
3.1.4. Caracterización del ZnO-NP	34
3.1.4.1. Espectroscopia IR	34
3.1.4.2. Espectroscopia de absorción UV-Visible	34
3.1.4.3. Difracción de rayos X (DRX)	35
3.1.4.4. Microscopia electrónica de transmisión (MET)	35
3.1.4.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés)	35
3.1.5. Evaluación de capacidad antifúngica del ZnO-NP, metodología <i>in vitro</i>	36
3.1.5.1. Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Aspergillus Niger</i> a partir de frutas y hortalizas afectadas	36

	pág.
3.1.5.2. Caracterización de las cepas estudiadas (MOAR)	37
3.1.5.3. Método de recuento de esporas	37
3.1.5.4. Determinación de la capacidad antifúngica de las nanopartículas de ZnO sintetizadas	38
3.2 OBTENCIÓN DE PELÍCULAS ANTIFÚNGICAS A PARTIR DE ALMIDÓN DE YUCA y ZnO-NP	40
3.2.1. Materiales	40
3.2.2. Equipos	40
3.2.3. Obtención de películas de almidón con ZnO-NP: método de casting	41
3.2.4. Evaluación de la capacidad antifúngica in vitro de las películas obtenidas por casting: método de discos	42
3.2.5. Obtención de películas a partir de almidón y ZnO-NP, método de extrusión-soplado	44
3.2.5.1. Obtención de pellets de almidón termoplástico (TPS) con ZnO-NP	44
3.2.5.2. Obtención de películas a partir de TPS con ZnO-NP	45
3.2.6. Evaluación de las propiedades de barrera, mecánicas, por tensión, de las películas obtenidas por extrusión-soplado.	47
3.2.6.1. Prueba de permeabilidad a vapor de agua (PVA)	47
3.2.6.2. Prueba de permeabilidad al oxígeno	48
3.2.6.3. Propiedades mecánicas de tensión.	49

	pág.
3.2.7. Evaluación de la capacidad antifúngica in vitro de las películas obtenidas por extrusión-soplado: método de discos	50
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS ZnO-NPs SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICAS	52
4.1.1. Espectroscopia IR de las nanopartículas de ZnO sintetizadas	52
4.1.2. Caracterización de las ZnO-NPs con Espectroscopia de absorción UV-Visible	55
4.1.3. Caracterización de las ZnO-NPs con difracción de rayos X (DRX)	56
4.1.4. Análisis de las ZnO-NPs sintetizadas usando Microscopia Electronica de Barrido (SEM) y Microscopia Electrónica de transmisión (MET)	57
4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS ZnO-NPs: METODOLOGÍA <i>in vitro</i>	59
4.2.1. Efecto del tratamiento con ZnO-NPs sobre cepas de <i>Aspergillus niger</i> y <i>Botrytis cinerea</i> .	59
4.2.2. Estudio con microscopia de alta resolución (MOAR) de la estructura de los hongos <i>Aspergillus niger</i> y <i>Brotrytis cinerea</i> sometidos a la acción de las nanopartículas de Zno	70
4.3. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA A PARTIR DE ALMIDÓN Y ZnO-NPs.	74
4.3.1. Obtención de películas de almidón con ZnO-NP: método de casting	74

	pág.
4.3.2. Determinación de la actividad antifúngica, <i>in vitro</i> , de las películas con almidón y ZnO-NPs obtenidas por casting: método de discos	76
4.3.2.1. Efecto de las películas conformadas con almidón y ZnO-NPs, obtenidas por casting, sobre el crecimiento del <i>A. niger</i> y del <i>B. cinerea</i> .	76
4.3.3. Obtención de películas a partir de almidón y ZnO-NP método de extrusión-soplado	84
4.3.4. Evaluación de las propiedades de barrera y mecánicas, por tensión, de las películas obtenidas por extrusión-soplado	85
4.3.4.1. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	85
4.3.4.2. Permeabilidad al oxígeno (PO)	85
4.3.4.3. Propiedades mecánicas de tensión	86
4.3.5. Determinación de la actividad antifúngica, <i>in vitro</i> , de las películas con almidón y ZnO-NPs obtenidas extrusión-soplado	89
5. CONCLUSIONES	93
6. RECOMENDACIONES	95
7. BIBLIOGRAFÍA	96
8. ANEXOS	105

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Lista de reactivos a emplear en la obtención del ZnO-NP	30
Cuadro 2. Lista de materiales y equipos que se usarán para obtener el ZnO-NP.	31
Cuadro 3. Tratamientos <i>in vitro</i> del diseño experimental, empleados para el analizar la capacidad antifúngica de las ZnO-NPs sintetizadas	39
Cuadro 4. Equipos usados para elaborar las películas de TPS con ZnO-NP	40
Cuadro 5. Formulación de las películas de almidón con ZnO-NPs conformadas por el método de casting.	41
Cuadro 6. Diseño experimental utilizado para determinar la capacidad antifúngica de las películas, conformadas por el método de casting	43
Cuadro 7. Formulaciones empleadas para la obtención de la película de almidón y ZnO-NPs por el método de extrusión.	45
Cuadro 8. Comparación entre las películas que contienen ZnO-NPs esférico o acicular y las películas sin ZnO-NPs	46
Cuadro 9. Bandas representativas de los espectros IR correspondiente a sólidos sintetizados con solvente ácido acético y etilenglicol	55
Cuadro 10. Valores de los parámetros relacionados con el crecimiento del <i>Aspergillus niger</i> considerando al hongo normal, testigo, así como de los obtenidos al tratarlo con diferentes concentraciones de ZnO-NPs.	62
Cuadro 11. Valores de parámetros derivados de las curvas de crecimiento del <i>Brotritis cinerea</i> , para los tratamientos antifúngicos realizados con las ZnO-NPs sintetizadas, considerando diferentes concentraciones y morfologías.	68

	pág.
Cuadro 12. Valores de los parámetros obtenidos de la curva de crecimiento de la cepa <i>Aspergillus niger</i> , para los diferentes tratamientos con películas que contenían las ZnO-NPs sintetizadas.	78
Cuadro 13. Valores de los parámetros obtenidos de la curva de crecimiento de la cepa de <i>Brotrytis cinerea</i> , para los diferentes tratamientos con películas que contenían las ZnO-NPs sintetizadas.	81
Cuadro 14. Resultados experimentales obtenidos de la prueba de PVA de películas de almidón que contienen ZnO-NPs con diferentes morfologías.	85
Cuadro 15. Resultados experimentales prueba de permeabilidad al oxígeno de películas de almidón con ZnO-NPs	86
Cuadro 16. Resultados experimentales obtenidos de la prueba de tensión de películas de almidón que contenían ZnO-NPs con diferentes morfologías.	87

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Síntesis de las ZnO-NPs morfología esférica: (a). Adición del agente precipitante al sistema etilenglicol – acetato de cinc y agua, (b) Eliminación de la fase líquida, (c). Precalcinado después de macerado, y (d). Polvos de ZnO obtenido después del tratamiento térmico a 600 °C	32
Figura 2. Síntesis de las ZnO-NPs con morfología acicular: (a). Proceso de secado del sistema; (b). Eliminación de la fase líquida (c). Precalcinado obtenido y (d). Polvo obtenido que se trató térmicamente a 600 °C/ 4 h.	33
Figura 3. Metodología utilizada para el aislamiento de las cepas de interés. (a). Tomate infectado con <i>Brotrytis cinerea</i> , (b). Campana extractora y (c). Incubadora.	37
Figura 4. Cepas fúngicas, con 7 días de crecimiento. (a). <i>Brotrytis cinerea</i> y (b). <i>Aspergillus niger</i> .	38
Figura 5. Procedimiento de casting. (a) Gelatinización de la mezcla almidón-glicerol-ZnO-NP, (b) moldeado de la película y (c) retirado manual de la película del molde.	42
Figura 6. Evaluación de la actividad antifúngica de los empaques de almidón con ZnO-NPs	43
Figura 7. Secado y acondicionamiento de la mezcla de almidón, glicerol - ZnO-NPs. (a) secado del almidón, (b) mezcla del almidón con el plastificante y el nanorelleno, y (c) almacenamiento de la mezcla.	44
Figura 8. Obtención del almidón termoplástico con ZnO-NPs. (a). Extrusión de la mezcla y obtención del TPS y (b). Secado de los pellets.	45

	pág.
Figura 9. Proceso utilizado para obtener películas de TPS con ZnO-NPs. (a) Extrusión de pellets de TPS con ZnP-NPs y (b) películas conformadas por extrusión-soplado.	46
Figura 10. Permeabilidad a vapor de agua (PVA) de las películas de TPS con ZnO-NPs. (a) Montaje realizado en la celda de permeación y (b) recipiente hermético con solución de cloruro de sodio saturada (68 %HR).	47
Figura 11. Materiales y equipos utilizados para realizar el ensayo de permeabilidad al oxígeno. (a) Micrómetro de espesores marca mituyoyo y (b) equipo usado para determinar la permeabilidad a gases (Permetm VAC-VBS gas).	49
Figura 12. Materiales y equipos utilizados para las propiedades mecánicas de tensión. (a) Probetas cortadas y (b) disposición del equipo y la muestra para la realización de la prueba de resistencia máxima a la tensión en la maquina universal de ensayos (Shimadzu, modelo EZ-L).	50
Figura 13. Espectros IR correspondientes a muestras sólidas sintetizadas con (a). Solvente ácido acético y (b). Solvente etilenglicol, tratadas térmicamente a 400 y 600 °C respectivamente	53
Figura 14. . Deconvolución del espectro IR entre 800 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , correspondientes a muestras sólidas sintetizadas empleando los solventes (a). Ácido acético y (b). Etilenglicol	54
Figura 15. Espectros UV-Visible correspondientes a muestras de ZnO sintetizadas en (a). Ácido acético (acicular) y (b). Etilenglicol (esférico)	56
Figura 16. Difractograma de rayos x de muestras sólidas obtenidas del sistema de acetato de cinc 0.34M a pH 8.4; y que fueron sometidos al proceso de lavado: (a) sin lavado, (b) primer lavado, (c) segundo lavado y (d) tercer lavado	57

	pág.
Figura 17. Micrografías obtenidas con (a). SEM y (b). MET y (c). Resultados de análisis químico elemental de las ZnO-NPs sintetizados en solvente ácido acético.	58
Figura 18. Micrografías obtenidas con (a). SEM y (b). MET y (c). Resultados de análisis químico elemental de las ZnO-NPs sintetizados en solvente etilenglicol.	59
Figura 19. Curvas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> sometido al tratamiento con: (a). ZnO-NP acicular y (b). ZnO-NP esférico, para diferentes concentraciones de óxido.	60
Figura 20. Curvas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> donde se comparan los tratamientos con ZnO-NPs que presentaban morfología acicular o esferoidal.	61
Figura 21. Secuencia de imágenes del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> con los diferentes tratamientos realizados empleando las ZnO-NPs sintetizadas. De izquierda a derecha 2, 4, 6 y 8 días de ensayo	64
Figura 22. Curvas de crecimiento de <i>Brotrytis cinerea</i> sin y con presencia de ZnO-NPs con morfología acicular, (a). Comparando con el crecimiento normal del hongo y (b). Sin la curva de crecimiento normal del hongo.	65
Figura 23. Curvas de crecimiento de <i>Brotrytis cinerea</i> sin y con presencia de ZnO-NPs con morfología acicular, (a). Comparando con el crecimiento normal del hongo y (b). Sin la curva de crecimiento normal del hongo.	66
Figura 24. Comparación de las curvas de crecimiento del <i>Brotrytis cinerea</i> al someterlo a tratamientos con ZnO-NPs, acicular y esférico, a diferentes concentraciones.	67
Figura 25. Secuencia de imágenes del crecimiento del <i>Brotrytis cinerea</i> con los diferentes tratamientos realizados empleando las ZnO-NPs sintetizadas. De izquierda a derecha 2, 4, 6 y 8 días de ensayo.	69

	pág.
Figura 26. Imágenes obtenidas con MOAR de los conidióforos, conidios e hifas del <i>Aspergillus niger</i> tratado con: (a) y (b) 0 mmol/L de ZnO (control), (c) 6 mMol/L de ZnO, (d) 9 mMol/L de ZnO, (e) 9 mmol/L ZnO y (f) 12 mmol/L de ZnO.	71
Figura 27. Imágenes obtenidas con MOAR de conidióforos, conidios e hifas de <i>Botrytis cinerea</i> tratado con ZnO-NPs, a concentraciones de: (a) y (b) 0 mmol/L (control), (c) 6 mMol/L, (d) 9 mmol/L, (e) 12 mmol/L y (f) 12 mmol/L.	73
Figura 28. Películas de almidón elaboradas por casting (a). Sin ZnO-NPs y (b). Con ZnO-NPs (2,5%).	75
Figura 29. Curvas de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en presencia de películas elaboradas con almidón y ZnO-NPs (diferentes morfologías y concentraciones).	77
Figura 30. Secuencia de imágenes que muestran el crecimiento del <i>Aspergillus niger</i> sometido a diferentes tratamientos con películas que contenían ZnO-NPs (diferentes concentraciones y morfología, de izquierda a derecha días 2, 4, 8 del ensayo).	79
Figura 31. Curvas de crecimiento obtenidas para el <i>Brotrytis cinerea</i> sometido a tratamiento con películas elaboradas a partir de almidón y que contenían ZnO-NPs.	80
Figura 32. Secuencia de imágenes que muestran el crecimiento del <i>Brotrytis cinerea</i> sometido a diferentes tratamientos con películas que contenían ZnO-NPs (diferentes concentraciones y morfología, de izquierda a derecha días 2, 4, 8 del ensayo).	82
Figura 33. Películas de almidón y ZnO-NPs, diferentes morfologías elaboradas por extrusión-soplado.	84

	pág.
Figura 34. Secuencia de imágenes que muestran el crecimiento del <i>Aspergillus niger</i> sometido a diferentes tratamientos con películas obtenidas por extrusión que contenían ZnO-NPs (de izquierda a derecha día 2 y 8 del ensayo).	90
Figura 35. Secuencia de imágenes que muestra el crecimiento del <i>Brotritis cinerea</i> sometido a diferentes tratamientos con películas obtenidas por extrusión que contenían ZnO-NPs (de izquierda a derecha días 2, 4, 8 del ensayo).	91
Figura 36. Contaminación presentada en los ensayos de actividad antifúngica con películas de TPS.	92

RESUMEN

En el presente trabajo se obtuvieron películas antifúngicas a partir de almidón y nanopartículas de óxido de cinc (ZnO-NPs) utilizando los métodos de casting y extrusión-soplado, evaluándose el efecto que tiene la adición de las NPs, sobre la actividad antifúngica principalmente y las propiedades mecánicas y de barrera de las películas conformadas. En primer lugar, se realizó la síntesis de las ZnO-NPs, por medio de rutas químicas, obteniendo partículas con dos morfologías (esférica y acicular) que posteriormente se caracterizaron con técnicas comúnmente usadas para este fin (espectroscopia IR y UV-vis, DRX, MET y SEM), también se evaluó su actividad antifúngica frente a los hongos *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, estudiando con MOAR los cambios estructurales presentados, después de ser tratados con el ZnO. En segundo lugar, se hizo la incorporación de las ZnO-NPs en una película de almidón elaborada por casting, con el propósito de estudiar su capacidad antifúngica contra los hongos mencionados y poder determinar una concentración adecuada para inhibir los patógenos. Con estos resultados fue posible obtener películas de almidón con ZnO-NPs por extrusión-soplado, a las cuales se les evaluaron sus propiedades mecánicas (comportamiento mecánico en tensión) y de barrera (permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno). Finalmente se determinó la actividad antifúngica de las películas conformadas por extrusión.

Palabras claves: Películas antifúngicas, ZnO-NPs, *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*

ABSTRACT

In this written were obtained antifungal films from starch and nanoparticles of zinc oxide (ZnO-NPs) using the casting methods and extrusion-blown, evaluating the effect of the addition of NPs, about the antifungal activity principally and the mechanical properties and films barrier conformed. First, performed the synthesis of ZnO-NPs through Chemical routes obtaining particles with two morphologies (spherical and Needles) later this were characterized with techniques commonly used for this purpose (Spectroscopy IR y UV-vis, DRX, MET Y SEM), also was evaluate the antifungal activity against the fungi *Botrytis cinera* and *Aspergillus niger*, studying with MOAR the structural changes presented, after to be treated with ZnO Second, was made the incorporation of ZnO-NPs in starch films made for casting, with the purpose to study it's antifungal capacity against the mentioned fungi and to be able to determine an concentration adequate to inhibit pathogens. With these results was possible starch films in wich to get starch layer films with ZnO- NPs by extrusion-blown, was evaluated the mechanical properties (mechanical behavior in tension) and barrier properties (water vapor permeability and oxygen permeability). Finally, was determined antifungal activity of films conformed for extrusion.

Key words: Antifungal films, ZnO-NP, *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger*

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el estudio de nanocompuestos con características biodegradables y propiedades funcionales es de amplio interés y encuentra aplicación en diversas áreas, entre las cuales cabe destacar la industria del envase y embalaje de alimentos. Entre los polímeros provenientes de fuentes botánicas el almidón de yuca es el más promisorio por ser de fácil disponibilidad y bajo costo (Carvalho, 2008; Mohammadi *et al.*, 2013; Woggum *et al.*, 2014). En la literatura se encuentran numerosas investigaciones de compuestos con base en almidón reforzados con nanoestructuras tales como nano-arcillas, nanotubos de carbono, etc. (Castaño *et al.*, 2013), para mejorar las propiedades mecánicas, eléctricas y/o térmicas del almidón termoplástico (TPS). De otro lado, el óxido de zinc (ZnO) se caracteriza porque actúa como agente anti-microbiano y/o antifúngico. Estudios indican que nanopartículas de este compuesto inorgánico inhiben el crecimiento de varias especies de hongos como es el caso del *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* (He., *et al.*, 2011 y Rajiv *et al.*, 2013), hongos que son la causa de podredumbres en poscosecha de frutas y hortalizas frescas durante el almacenamiento y el transporte, además de importantes pérdidas económicas en la fase de comercialización, provocando el deterioro patológico: podredumbre, mohosidad (gris y negra) y manchas a nivel de la corteza, ocasionando el crecimiento de pigmentos, decoloración, descomposición, desarrollo de malos olores y sabores desagradables, formación de micotoxinas, causantes de posibles efectos nocivos sobre la salud humana; todo esto con lleva al deterioro de la calidad de las frutas y hortalizas, reduciendo su valor en el mercado (Juárez *et al.*, 2010). Sumado a lo anterior, el ZnO no es tóxico para el hombre (FDA, 2013), por ende, su aplicación en la industria del envase de alimentos es también promisoria. Actualmente el interés está centrado en las ZnO-NPs porque, se ha encontrado que su uso como nanorelleno, en la elaboración de películas plásticas, ayuda a mejorar las propiedades de permeabilidad al vapor de agua (VPA), permeabilidad a los gases y protección UV (Nafchi, *et al.*, 2012 y 2013; Castaño *et al.*, 2013), además de poderse utilizar como un eficaz fungicida, en aplicaciones de seguridad agrícola y alimentaria. Actualmente se investiga la factibilidad de incorporar ZnO-NP en películas plásticas y otros materiales de embalaje (Castaño *et al.*, 2013), con el fin de contribuir a mejorar las condiciones poscosecha de las frutas y hortalizas, controlando hongos fitopatógenos y evitando pérdidas económicas.

Una forma de controlar estos microorganismos ha sido usando fungicidas químicos, a través de tratamientos térmicos, aplicando aceites esenciales, entre otros (Juárez *et al.*, 2010). El aumento de la resistencia de algunos hongos patógenos en poscosecha a estos medios de control, la residualidad generada en los frutos y la creciente demanda de los consumidores de frutas y hortalizas de alta calidad, han incrementado los esfuerzos para desarrollar medios de control alternativo o

complementario más eficientes contra estos fitopatógenos (Gatto *et al.*, 2011). Es, por lo tanto, de gran interés investigar el efecto de las nanoestructuras de ZnO sobre los hongos *Botrytis cinérea* y *Aspergillus niger*, que afectan a frutas y hortalizas ocasionando pérdidas económicas en poscosecha y determinar cómo se ve afectada esta capacidad al ser incorporadas a películas activas de almidón de yuca. Con el desarrollo de esta de investigación se pretende abrir la posibilidad de iniciar un trabajo sistemático en un campo de investigación de interés, como es la elaboración de películas activas (antifúngicas) que contengan óxido de cinc nanoparticulado (ZnO-NP), propuesta innovadora que serviría como fundamento y soporte para estudios posteriores, que busquen aportar al fortalecimiento de nuevas alternativas productivas para la región.

En este trabajo se realizaron películas con base en almidón extraído de yuca (Variedad Verónica), originaria de Paraguay y aditivadas con nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs ZnO) que fueron sintetizadas en laboratorio obteniendo partículas con morfología acicular y esférica que arrojan propiedades físico químicas distintas. Las películas fueron conformadas por medio del método “solución-casting” y Extrusion-soplado. Las propiedades anti-fúngicas, de barrera y mecánicas, de las películas obtenidas se caracterizaron. Según el contenido de NPs de ZnO las propiedades mecánicas y de barrera fueron afectadas al igual que la respuesta antifúngica frente al *Aspergillus niger* y al *Botrytis cinerea*.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. LOCALIZACIÓN

El proyecto se desarrolló en diferentes instalaciones de la Universidad del Cauca. La síntesis y obtención del ZnO-NP se realizó en el laboratorio del grupo de investigación Ciencia y Tecnología de los Materiales Cerámicos (CYTEMAC); el seguimiento de la actividad antifúngica del ZnO-NP sintetizado y de las películas activas conformadas se hizo en el laboratorio de Microbiología, los dos situados en la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. En la Unidad de Microscopia Electrónica de la Vicerrectoría de Investigaciones se desarrollaron mediciones de carácter morfológico de las cepas de hongos estudiadas e identificación de tamaño y morfología del ZnO-NP. Por último, la elaboración de la película activa de almidón se realizó en el laboratorio de Reología y Empaques del grupo de investigación Ciencia y Tecnología de Biomoléculas de Interés Agroindustrial (CYTBIA) de la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicadas las instalaciones nombradas anteriormente en el Municipio de Popayán a una altura de 1738 msnm, una temperatura media de 18 °C y una humedad media de 77,75% (Alcaldía de Popayán, 2014).

2.2. MARCO TEÓRICO

El tema central de este trabajo de grado está relacionado con la elaboración de empaques para alimentos, específicamente para frutas y hortalizas cuyo objetivo es contener el alimento de manera efectiva, a bajo costo, satisfaciendo los requerimientos industriales y del consumidor, manteniendo la calidad del alimento y minimizando el impacto ambiental (Marsh y Bugusu, 2007). El empaque debe retardar el deterioro del producto, retener los efectos benéficos del mismo, extender su vida en anaquel y mantener o incrementar la calidad y seguridad del alimento. La protección suministrada por el empaque debe considerar, principalmente, tres tipos de influencias externas: químicas, biológicas y físicas. Para este trabajo fue de interés la segunda influencia o sea la de suministrar una barrera de protección contra microorganismos, agentes patógenos por ejemplo, concretamente sobre *Brotritis cinerea* y *Aspergillus niger*.

2.2.1. Producción hortofrutícola en Colombia: problemas y pérdidas poscosecha. En Colombia la producción de frutas y hortalizas presentó una tendencia ascendente: entre 2008 y 2013 la superficie hortofrutícola cultivada creció a una tasa del 2,5% anual, pasando de 952 mil a 1.083.310 ha. Del mismo modo, la producción nacional aumentó de 10,5 millones de toneladas, en 2008, a 12,2 millones de toneladas, en 2013, creciendo a una tasa del 2,9% anual, siendo las

líneas productivas de mayor dinamismo: plátano, papa, tomate, cítricos y piña, con una participación de aproximadamente 68% del total hortofrutícola y un incremento similar a la tendencia evidenciada. La producción de frutas y hortalizas contribuyó con un 46,2% al total del sector agrícola de 2013, lo cual ubicó a este subsector como uno de los más relevantes para el desarrollo del agro en Colombia, siendo superado únicamente, por la caña panelera y de azúcar. Por otro lado, en el 2013, los departamentos con mayor participación en la producción frutícola fueron: Santander, Valle del Cauca y Antioquia, mientras que la producción hortícola se centró en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Antioquia. Es importante resaltar que, en términos del volumen de producción, la tasa de crecimiento del sector hortofrutícola (2,9%) fue superior a la producción agrícola nacional (1,3%), comportamiento similar al área sembrada, ya que la extensión de tierras destinadas para cultivos hortofrutícolas creció a una tasa de 2,5%, en contraste con el total agrícola que presentó una tasa de crecimiento del 1% (Asohofrucol, 2014).

Las frutas y hortalizas frescas son productos perecederos porque tienen una tendencia inherente a deteriorarse por razones fisiológicas y por la invasión de plagas (insectos, hongos y bacterias), infecciones y enfermedades. Las pérdidas poscosecha ocurren en cualquier etapa del proceso de mercadeo, se pueden iniciar durante la cosecha o, después, durante el acopio, la distribución y el transporte y, aún, finalmente cuando el consumidor compra y utiliza el producto. En los países en desarrollo como Colombia, en donde existe una gran deficiencia en la infraestructura de mercadeo, las pérdidas poscosecha de productos frescos varían entre 25 y 50% de la producción, lo que representa una pérdida significativa de alimentos y un considerable daño económico para los comerciantes, especialmente para los productores (FAO, 2012).

Existen muchas causas que ocasionan pérdidas en la etapa de poscosecha de frutas y hortalizas y se pueden agrupar en primarias y secundarias. Las primarias son aquellas que son influenciadas por factores biológicos y microbiológicos, entre las que se encuentran las producidas por causas químicas y bioquímicas (contaminación con pesticidas y productos químicos, toxinas, sabor, color y aromas desagradables producidos por reacciones bioquímicas y enzimáticas), mecánicas (cortes, heridas y golpes) y fisiológicas (envejecimiento, deshidratación, respiración y transpiración). Por otro lado, las causas secundarias son producidas por una planificación inadecuada de la producción y de la cosecha, infraestructura de almacenamiento y/o administración inadecuadas, y/o por el transporte y sistemas de mercadeo inadecuados (FAO, 2012; Infoagro, 2013). Es necesario tener en cuenta que el desconocimiento de adecuadas técnicas de empaque y embalaje de frutas y hortalizas por parte de los productores y comercializadores, ocasiona considerables pérdidas económicas en la exportación de estos productos a mercados regionales y extranjeros. Desafortunadamente los empaques más usados para productos hortofrutícolas en la actualidad son: cajas de cartón corrugado o de

madera, papel, bolsas de polietileno, virutas, bandejas de pulpa moldeada o de poliestireno, etc., no son los más apropiados para este fin por las elevadas pérdidas que estos empaques generan. (Infoagro, 2013).

Dentro de las causas primarias, los hongos son responsables de innumerables pérdidas en frutas y hortalizas, entre ellos se destacan algunas especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor*. Indudablemente, estos hongos necesitan condiciones de temperatura y humedad adecuadas para poder germinar, además de la presencia de daños mecánicos en la superficie del producto. Esta última es una condición casi obligatoria para el desarrollo de muchas enfermedades, no todas necesariamente, ocasionadas por los hongos durante la poscosecha, esto debido a que son la vía para penetrar al interior del producto. Sin embargo, ciertas especies de hongos son capaces de penetrar directamente la piel de frutas y hortalizas y causar el mismo daño. Desafortunadamente, las condiciones mencionadas se presentan con frecuencia en los ambientes en los cuales se manipulan los productos hortofrutícolas (Villalobos *et al.*, 2009 y Juárez *et al.*, 2010).

2.2.2. Problemas y pérdidas poscosecha causados por *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*. El *Botrytis cinerea* es un moho que produce conidióforos largos, delgados y con frecuencia pigmentados. El micelio es septado, los conidios nacen en células apicales y son de color gris, aunque pueden ser negros. Esta especie de hongo, a tener en cuenta en la manipulación y comercialización de frutos y hortalizas por las pérdidas provocadas, se desarrolla mejor en clima fresco y húmedo y es el agente causal de la podredumbre gris en manzanas, peras, frambuesas, fresas, moras, uvas, limones, toronjas y frutos de hueso (Juárez *et al.*, 2010) y hortalizas como ajo, brócoli, cebolla, coliflor, lechuga, perejil, repollo, entre otras (Villalobos *et al.*, 2009). Este hongo posee la capacidad de degradar la epidermis e ingresar a un fruto vecino desde un fruto afectado generando una nueva podredumbre; no obstante la afección se inicia desde un primer fruto en el cual la espóra ingresa por una herida (Juárez *et al.*, 2010).

Otro hongo responsable de innumerables pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas es el *Aspergillus niger*, hongo filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas) que presenta micelio bien desarrollado con pequeños cuerpos fructíferos no pendiculados, aéreos y que se propaga por conidios, el cual produce un moho negro común en manzanas, peras, uvas y en cítricos como el limón y la naranja; este hongo también afecta hortalizas, entre ellas al ajo, cebolla, brócoli, tomate, lechuga y acelga (Villalobos *et al.*, 2009). Este microorganismo, para su desarrollo sobre la superficie de frutas y hortalizas, necesita condiciones de humedad elevada, temperatura entre 25 y 35°C y un medio con pH ácido. Tras el crecimiento del hongo, las hilachas de las raíces invaden el alimento

profundamente, generando, además de putrefacción y decoloración, micotoxinas y/o aflatoxinas que pueden producir enfermedades en los seres humanos al consumir frutas y hortalizas contaminadas con este hongo (Osuna *et al.*, 2013; Insuasty y Perdomo, 2015).

2.2.3. Métodos de control fúngico en frutas y hortalizas. Una forma comúnmente empleada para tener control sobre los hongos fitopatógenos ha sido el uso de fungicidas químicos. En la actualidad existen en el mundo más de 113 ingredientes activos registrados como fungicidas, sin embargo, hay problemas con el uso eficaz de estos productos químicos en las zonas donde los hongos han desarrollado resistencia a los mismos (Gatto *et al.*, 2011). Con el fin de reducir la dependencia del uso de compuestos químicos, se está trabajando en el desarrollo de métodos alternativos para prevenir y controlar el crecimiento de hongos, uno de ellos es el tratamiento térmico con vapor y aire caliente, posibilidad relativamente fácil de aplicar sobre frutas y hortalizas, que no deja residuos químicos y que presenta una mediana eficiencia en el control de estos patógenos. Otra alternativa de control fúngico es la aplicación de aceites esenciales a los productos hortofrutícolas a proteger, proceso que goza de gran aceptación debido a que es menos perjudicial para el consumidor y el medio ambiente, ya que se utilizan extractos de origen natural (Juárez *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha considerado la incorporación o inmovilización de antimicrobianos en los empaques que se usan para almacenar y transportar los productos hortofrutícolas; estos envases liberan de manera controlada los agentes antifúngicos, a la superficie del alimento, y son capaces de inhibir o reducir el crecimiento microbiano utilizando para ello una cantidad mínima de agente incorporado comparado con las cantidades que se incorporan directamente en el alimento (Martínez y López, 2011). Un método de control, más reciente y novedoso de los hongos fitopatógenos, ha surgido de la nanotecnología e involucra el uso del óxido de cinc (ZnO-NP) nanoparticulado, compuesto que ha mostrado su eficiencia antifúngica en cepas de los hongos evaluadas hasta el momento (He *et al.*, 2011 y Sharma *et al.*, 2015).

2.2.4. Empaques activos con funcionalidad antifúngica. Si se compara con los objetivos convencionales de un empaque para alimentos, los empaques activos con agentes antimicrobianos (AM) están diseñados para controlar el crecimiento de los microorganismos que afectan, directamente, la estabilidad del alimento. Las principales acciones que un empaque antimicrobiano o antifúngico debe cumplir considera la inocuidad de los alimentos, mantenimiento su calidad y extensión de vida en anaquel (Martínez y López, 2011). Específicamente, el uso de empaques antifúngicos surge como una posible solución para controlar el crecimiento de fitopatógenos en frutas y hortalizas, especialmente durante el tiempo de conservación poscosecha (Junqueira-Gonçalves *et al.*, 2013), extendiendo la vida útil y seguridad de los alimentos listos para el consumo (Moditsi *et al.*, 2014). El uso de envasado antimicrobiano puede ser eficaz durante el período de

almacenamiento, manipulación y el transporte del producto (Van y Dantigny, 2016). Estos empaques reducirían las dificultades que trae consigo la adición de agentes antimicrobianos directamente al producto, donde hay que considerar la pérdida de actividad por lixiviación y reacciones con otros compuestos (lípidos y proteínas), estrategia que propiciaría una actividad antifúngica más extensa, durante toda la cadena de distribución (Martínez y López, 2011).

En la actualidad, se vienen incorporando diferentes agentes antimicrobianos directamente a los materiales que conforman el empaque, siendo los más utilizados en el sector alimentario los siguientes: aceites esenciales (por ejemplo, aceite esencial de canela), extractos de plantas (por ejemplo, extracto de limón), bacteriocinas (por ejemplo, nisina), enzimas (por ejemplo, lisozima), quitosano, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido láurico), nanomateriales (por ejemplo, nanopartículas de plata), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), entre otros (Liu *et al.*, 2010 Ibarra *et al.*, 2016). Estos agentes pueden ser colocados como recubrimiento o inmovilizados en diferentes polímeros de origen natural, en forma de películas, charolas y contenedores. Los procesos térmicos como extrusión, fundición, inyección y moldeo han sido empleados para la incorporación de los agentes antimicrobianos en los empaques. Sin embargo, debido a los problemas de toxicidad y la poca estabilidad y compatibilidad de los polímeros con los antimicrobianos, se limita su uso a solo ciertas sustancias (Martínez y López, 2011; Van y Dantigny, 2016).

Sistemas activos que inmovilizan a un agente antimicrobiano (AM), en o sobre la matriz de un polímero, se están actualmente desarrollando. Este tipo de embalaje no libera los AM al medio, pero suprime el crecimiento de los microorganismos en la superficie de contacto. Por lo tanto, un sistema de inmovilización necesita establecer un contacto directo entre los materiales de empaque y el producto alimenticio (Ibarra *et al.*, 2016). En los últimos años, el número de investigaciones sobre el envasado de alimentos en materiales biodegradables con agentes AM, tales como proteínas, polisacáridos y lípidos, se ha incrementado. Muchos AM, como los aceites esenciales, las enzimas y las bacteriocinas, han sido efectivamente incorporados en películas biodegradables. Permitiendo el control o la inhibición del crecimiento de microorganismos en la superficie del alimento, extendiendo la vida útil del producto, manteniendo su calidad y seguridad. Los agentes antimicrobianos tienen una actividad de inhibición específica contra ciertos microorganismos particulares y es de importancia establecer las concentraciones requeridas, que deberían ser incorporados, para una inhibición eficaz del patógeno. Indudablemente, la actividad antimicrobiana puede variar cuando estos agentes se incorporen al embalaje; adicionalmente, se debe elegir el AM y el material adecuado para un determinado alimento (Ibarra *et al.*, 2016).

2.2.4.1. Obtención de empaques de origen natural. Entre los principales materiales utilizados para el envasado de alimentos, los plásticos derivados del petróleo han sido de lejos los más utilizados desde mediados del siglo XX, sobre todo debido a sus ventajas técnicas. Además de ser baratos, estas materias primas presentan buena calidad estética y poseen excelentes propiedades físico-químicas, que justifican porque más del 40% de los plásticos están destinados para el embalaje (Rhim *et al.*, 2013). Hoy en día, los empaques más empleados en la industria alimentaria son fabricados con base en plásticos sintéticos, por ejemplo, el PET, PP, PVC, PE, PS, etc., que al ser desechados ocasionan la contaminación de efluentes y depósitos naturales de agua, y si son incinerados los gases emitidos son tóxicos y venenosos, procesos que pueden ocasionar, entre otros efectos, la muerte de animales, tales como aves, tortugas, leones marinos y peces, que los pueden ingerir de manera directa al confundirlos con alimento (Caballero., 2010).

Considerando esta problemática de contaminación, y con el fin de propiciar funcionalidades específicas al empaque, existe un creciente interés en el uso de polímeros de origen natural. Recientemente, la investigación en biomateriales se ha incrementado, esto con el fin de determinar cuáles materiales son los más sostenibles, o sea de más fácil biodegradabilidad comparándolos con los polímeros sintéticos. Varios biopolímeros como PLA, PHA, PCI, y la PEA, ahora se producen industrialmente y, en los últimos años, el estudio relacionado con su uso como materiales de embalaje, utilizados en la agricultura, ha aumentado. (Silva *et al.*, 2016) Por lo tanto, el uso de los biopolímeros emerge como una alternativa sostenible, particularmente interesante, en aplicaciones a corto plazo para el envasado de alimentos, específicamente de frutas y hortalizas y en la elaboración de filmes (películas plásticas), botellas, cajas, canastas y muchos otros materiales, de gran versatilidad si se comparan con otros materiales de embalaje. Además, los polímeros de origen natural presentan propiedades que se pueden modificar relativamente fácil, generando la posibilidad de obtener polímeros con nuevas propiedades, ampliando sus posibilidades de uso (Moncada, 2007).

Uno de los biopolímeros más estudiado en la elaboración de empaques de origen natural es el almidón, homopolímero constituido de 98 a 99% por amilosa y amilopectina (Frost, 2010; Lescher, 2010 y Rojas, 2012). El primer compuesto corresponde a una estructura lineal con enlaces glucosídicos α -D-(1 \rightarrow 4) mientras que el segundo correspondería a una molécula con estructura química similar a la anterior, pero con enlaces α -D-(1 \rightarrow 6) (Shanks y Kong, 2012 y Prachayawarakorn, 2013). El almidón también contiene pequeñas cantidades de lípidos, fosfatos y proteínas (Chen *et al.*, 2011). Es por su composición y estructura química que el almidón es considerado como un material promisorio para la ingeniería de empaques, pudiéndose emplear ampliamente en este sector debido a su bajo costo, baja densidad, baja toxicidad y biodegradabilidad (Lescher, 2010; Stevens *et al.*, 2010 y Woggum *et al.*, 2014; Abreu, 2015). En la actualidad, el almidón, en forma

de almidón termoplástico (TPS), está siendo investigado como material interesante para el desarrollo de empaques de origen natural (Carvalho, 2008; Mohammadi *et al.*, 2013 y Woggum *et al.*, 2014) debido a que es totalmente biodegradable, y es uno de los materiales más útiles y prometedores como embalaje (Wattanakornsir Mohammadi *et al.*, 2011; Mościcki *et al.*, 2012 y Mościcki *et al.*, 2013). Normalmente, este material se obtiene modificando la estructura interna del gránulo de almidón a través de un proceso de extrusión, con bajo contenido de agua, que propicia fuerzas térmicas y mecánicas, en presencia de plastificantes (glicerol, sorbitol) (Villada *et al.*, 2008). La diferencia entre el contenido de agua y glicerol, y las condiciones de proceso, como la velocidad de cizalla y temperatura, producen diferencias en la formación de la red de almidón y en la morfología del material producido (Arboleda, 2014). Dado que en el presente proyecto se van a incorporar nanoestructuras de ZnO, esto podría ocasionar modificaciones tanto en el proceso como en la dosificación para obtener el biopolímero modificado.

Con el fin de optimizar esta funcionalidad se viene usando la nanotecnología para el desarrollo de envases activos (antifúngicos) de origen natural que contengan nanoestructuras como una estrategia interesante en gran parte por la industria de envasado de alimentos. Por otro lado, es necesario considerar que una de las dificultades del uso del TPS está relacionada con su poca estabilidad cuando las condiciones de humedad son muy altas (Villada *et al.*, 2008).

2.2.4.2. Uso de la nanotecnología para la obtención de empaques antifúngicos.

La nanotecnología se define como el estudio y uso de estructuras entre 1 y 100 nm de longitud (en al menos una de las dimensiones según la iniciativa nanotecnológica nacional en Estados Unidos), entre ellas las nanopartículas, las cuales presentan propiedades diferentes a sus correspondientes materiales a nivel micro y macro. Es por esto que se vienen evaluando e incorporando en diferentes desarrollos científicos y tecnológicos; están por ejemplo, en diferentes etapas de la cadena alimentaria, desde la agricultura hasta el procesamiento de los alimentos, y lógicamente en los empaques utilizados para el manejo y almacenamiento de los mismos (Kanmani y Rhim, 2014). En la industria alimentaria, la nanotecnología presenta diversas aplicaciones como el uso de nano-sensores y nano-chips para el aseguramiento de la calidad y la seguridad de los productos alimenticios, dispositivos que pueden funcionar como “nariz” o “lengua” electrónica, útiles para detectar frescura y vida útil de un alimento o que tienen la capacidad de indicar el estado de conservación, revelar la presencia de microorganismos patógenos, aditivos, fármacos, metales pesados, toxinas y otros contaminantes, así como nano-alimentos con propiedades funcionales nutritivas y saludables o con mejores propiedades organolépticas, desarrollo de nano-envases y embalajes para productos alimenticios con mejores características de barrera (frente a la penetración de gases y agua), para atender los requisitos de conservación de frutas, hortalizas, bebidas, etc. También, pueden ser obtenidos polímeros con

nanomateriales que propician una mayor resistencia a la luz y mejores propiedades mecánicas y térmicas (Cordeiro, 2012; Nafchi, *et al.*, 2012 y 2013; Castaño *et al.*, 2013). Estas características de los materiales, si son utilizados como embalaje para el alimento, pueden favorecer los tiempos de almacenamiento del producto, menores pérdidas de las características químicas, físicas y organolépticas, y, además, facilitar su transporte (Nanotecnología.cl, 2013).

Específicamente, el óxido de cinc (ZnO), es un polvo blanco de masa molecular 81,40 g, casi insoluble y ligeramente alcalino en agua, que forma cristales hexagonales con estructura tipo wurtzita. El punto de fundición del ZnO es 1975 °C y su densidad relativa es de 5,6 g/cm. Este semiconductor no es tóxico ni irritante y es un compuesto anfótero que se disuelve tanto en ácido, formando sales, como en bases produciendo cincatos (Montero *et al.*, 2012). Las aplicaciones industriales más extendidas y tradicionales de este óxido son en la producción de goma, donde disminuye el tiempo de vulcanización, y como pigmento en la producción de pinturas, así como en la industria farmacéutica, en el campo de la cosmética, donde se utiliza como filtro de radiación ultravioleta en la producción de cremas solares (Stoimenov *et al.*, 2002, Montero *et al.*, 2012). El ZnO es uno de los nanomateriales estudiados hoy, para ser utilizado como nanorelleno en empaques, el cual por sus diversas características fisicoquímicas, presenta gran posibilidad de ser incluido en biopolímeros con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera, aumentando la posibilidad de estos, para ser usados como materiales para la fabricación de empaques y embalajes para alimentos (Nafchi *et al.*, 2013). El ZnO está clasificado dentro de un género de aditivos alimentarios reconocidos generalmente como seguros (GRAS por sus siglas en inglés), por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y en la actualidad se utiliza dentro de las industrias como aditivo alimentario (Espitia *et al.*, 2016). Por otro lado, varios estudios han demostrado que las nanopartículas de ZnO tienen una toxicidad selectiva para las bacterias y efectos mínimos sobre las células humanas, lo que ha despertado un gran interés sobre sus aplicaciones potenciales en las industrias agrícolas y alimentarias (Siracusa, 2016).

2.2.4.3. Procesos para la obtención de películas de almidón de yuca. Existen diferentes procesos para obtención de películas de almidón de yuca, de los cuales la extrusión, es uno de los más utilizado y estudiados en la actualidad. La extrusión es un proceso mecánico de transformación donde el material en estado fundido es forzado a atravesar una boquilla por medio del empuje generado por la acción giratoria de un tornillo o dos, en el cual se expone el material a alta temperatura, fuerza de cizallamiento y presión durante un corto período de tiempo (Vera, *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013), generando modificaciones químicas o reacciones de polimerización. Este proceso ha demostrado ser un método eficaz de producción a bajo costo, que mejora la viabilidad comercial y la competitividad de los materiales usados (Yagci y Gogus, 2009; Ocaña, 2013). La extrusión soplado es el método

más popular de procesamiento de polímeros, comúnmente utilizado en la fabricación de materiales de embalaje (Mościcki *et al.*, 2012) que se puede describir como una operación en la que una extrusora funde, dosifica, mezcla, cizalla, transporta y bombea el material plástico a la sección de formado, en donde por medio de la introducción de aire por el cabezal, se forma una burbuja caliente que es enfriada por un flujo de aire a alta velocidad (Delgado *et al.*, 2013).

El casting es la técnica más utilizada para la producción laboratorial de películas basadas en almidón, esta consiste en verter una suspensión sobre placas pequeñas (una placa de petri, por ejemplo), controlando el espesor medio de las películas resultantes de la masa de suspensión vertida sobre la placa; las variaciones locales suelen ser inevitables. Este proceso no es conveniente para formar películas mucho más grandes que 25-30 cm², dando lugar a dificultades de la ampliación. La mayoría de los estudios informan que el secado de la suspensión tiene lugar a temperatura ambiente o en hornos con circulación de aire forzada a temperaturas moderadas (30-40°C), que requieren tiempos de secado prolongado (10-24 h). Aunque el método de casting se ha utilizado en las investigaciones sobre películas basadas en almidones y proteínas, tiene dos desventajas importantes: (i) la dificultad de ampliar su producción a un tamaño mayor y (ii) los tiempos de secado largos. Estos inconvenientes hacen esta técnica impracticable a escala industrial (Müller *et al.*, 2009 y Oliveira *et al.*, 2013).

2.3. MARCO HISTÓRICO

Recientemente, el desarrollo de empaques que eviten el crecimiento de agentes microbianos y además mitiguen el impacto ambiental ha tomado un gran auge, más si se considera el ciclo de vida que los empaques tradicionales sintéticos presentan. Por otro lado, a través de la investigación se han planteado alternativas viables a la problemática ocasionada por la acción patógena de los diferentes microorganismos, los agentes antimicrobianos que se mezclan directamente en las formulaciones de alimentos procesados, en algunos casos, en cantidades excesivas lo que puede llevar a afectar la salud del consumidor. En el caso de frutas y hortalizas, con el fin de proteger o aislar de patógenos, normalmente se utilizan recubrimientos con ceras, aceites esenciales, entre otros (Quintero, 2012). Por lo tanto, la posibilidad de disminuir la contaminación con desechos orgánicos y el usar agentes antimicrobianos sobre los alimentos, de manera directa, ha generado una interesante dinámica científica en la formulación de nuevos empaques (Foolmaun *et al.*, 2012 y Dantigny *et al.*, 2016). Además, el uso de almidón como materia prima en la elaboración de películas se ha venido estudiando, obteniéndose resultados que muestran la potencialidad y las limitaciones intrínsecas que presenta este polímero natural, económico y renovable. Ya que la naturaleza hidrofílica de los

almidones plastificados puede adecuarse a las condiciones del entorno mediante la adición de fibras y/o rellenos (Chen et al., 2009). Sin embargo, a pesar del esfuerzo por reemplazar plásticos por biopolímeros, ha surgido un inconveniente relacionado con la susceptibilidad que estos últimos presentan a la acción patogénica de microorganismos, que es más problemático cuando se considera su uso como empaque para alimentos no procesados. Para evitar este problema, se ha incorporado, a la matriz polimérica de origen natural: aceites esenciales, sustancias ácidas y alcalinas, extractos de plantas, materiales inorgánicos, entre otros. (Dantigny et al., 2016).

Estudios sobre materiales empleados como agentes antimicrobianos y/o antifúngicos evidencian la importancia de estos en el sector alimenticio, por ejemplo Lopes y colaboradores (Lopes et al., 2014) desarrollaron una película con cinamaldehído con actividad antimicrobiana, para productos de panadería y la aceptación del producto por los consumidores. Se analizaron muestras de pan recubiertas con películas que contenían 5 a 10% peso/volumen (v/w) de cinamaldehído, encontrándose que ellas son eficaces en la inhibición del crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos *Staphylococcus spp.* Un estudio interesante fue el realizado por Souza y colaboradores (Souza et al., 2013). Ellos eligieron aceites esenciales de canela y clavo de olor para ser incorporados en películas de almidón de yuca, con el fin de desarrollar un envase activo, evaluando las propiedades mecánicas y de barrera, así como su actividad antimicrobiana contra *Penicillium commune* y *Eurotium amstelodami*, encontrando que la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial que inhibió el crecimiento del *P. commune*, fue de 2 g de aceite de canela y de 16 g de aceite de clavo en 100 g de película, y para el *E. amstelodami* 0.5 g de aceite de canela y 16 g de aceite de clavo en 100 g de película, diferencias significativas en las propiedades de las películas dependiendo del contenido de aceite esencial.

Considerando específicamente el ZnO, existen trabajos que evidencian el gran interés que existe sobre el uso de este óxido metálico como antimicrobiano. Pasquet y colaboradores (Pasquet et al., 2013) investigaron la actividad antimicrobiana de tres polvos comerciales de ZnO que se diferenciaban en tamaño y forma de partícula, superficie específica, porosidad y tamaño del agregado de partículas, en suspensiones acuosas, sobre cinco cepas microbianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, evaluando la relación entre los parámetros estructurales de las nanopartículas y su actividad microbiana. Los resultados mostraron que la concentración de ZnO y el tiempo de acción eran importantes y que tanto el tamaño de cristalito como la porosidad eran parámetros trascendentales en la justificación de la eficiencia del ZnO como material antimicrobiano.

De los intereses que tienen los investigadores sobre la actividad antifúngica de las nanopartículas, se pueden destacar los relacionados con la obtención de las nanopartículas más eficientes con esta funcionalidad, determinación del mecanismo que propicia la inactivación de los hongos y la forma más adecuada de emplear y aplicar estas nanoestructuras, considerando su uso específico. Dentro de las características que presentan las nanopartículas, sus propiedades superficiales son muy importantes ya que ellas determinan el grado de aglomeración de las mismas, su movilidad y su interacción con los hongos (Navarro et al., 2008). En general, los efectos antifúngicos de las nanoestructuras dependen de sus propiedades físico-químicas e incluyen efectos de obstrucción, disolución de las mismas, con la generación de iones y/o compuestos tóxicos, y/o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), mecanismos que aún no han sido dilucidados. Indudablemente, la radiación solar, específicamente la componente UV, es muy importante para la actividad antifúngica que presentan las nanopartículas de ZnO debido a que puede favorecer la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS por su sigla en inglés) y la disolución foto-inducida (Mag et al., 2014); es innegable la importancia que, sobre la capacidad antifúngica de las nanopartículas, tiene la irradiación de las mismas con una cierta longitud de onda (Yang y Yinfa, 2014).

Con relación a la obtención de las nanopartículas de ZnO y su uso como fungicida, la investigación ha estado muy activa tratando de optimizar los métodos de síntesis y en obtener el material más eficiente. Sharma y Ghose (Sharma y Ghose, 2015) sintetizaron nanopartículas de ZnO usando un método de precipitación homogéneo, sin usar surfactante o agentes quelatantes o gelatantes. Los resultados que obtuvieron mostraron que las nanopartículas de ZnO que sintetizaron presentaban una buena actividad antifúngica sobre la *Candida albicans*, funcionalidad que se incrementó al utilizar una mayor concentración de las mismas. Un trabajo muy interesante, sobre determinación de la capacidad antifúngica de las nanopartículas de ZnO, es el de He y colaboradores (He et al., 2011), evaluaron la actividad antifúngica del ZnO, con un tamaño de partícula de 70 ± 15 nm, sobre dos hongos patógenos que son frecuentes en las frutas en la etapa de poscosecha: *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. Los resultados mostraron que en concentraciones mayores a 3 mmol^{-1} se inhibía significativamente el crecimiento de estos hongos y que el *P. expansum* era más sensible al tratamiento. Indicaron que las nanopartículas inhibían el crecimiento de la *B. cinerea* porque afectaban sus funciones celulares, ocasionando deformaciones en las hifas del hongo, mientras que en el *P. expansum* ellas impidieron el desarrollo de los conidióforos y la conodia, lo que condujo a la muerte de las hifas, sugiriendo que las nanopartículas de ZnO pueden ser usadas como un fungicida efectivo en la agricultura y en la industria alimenticia.

Janiki y Colaboradores (Janiki *et al.*, 2015) sintetizaron ZnO usando un ruta verde, empleando para ello el extracto seco proveniente del jengibre (*Zingiber officinale*). Para determinar su actividad antifúngica mediante una prueba de sensibilidad, encontrando una relación directa entre la concentración empleada y las zonas de inhibición de los hongos *Candida albicans* y *Penicillium notatum*. Salarbashi y colaboradores (Salarbashi *et al.*, 2016) incorporaron nanopartículas de ZnO a un compuesto polisacárido de soya soluble (SSPS por sus siglas en inglés) y evaluaron su capacidad anti-moho, así como sus propiedades físicas y mecánicas: Los resultados mostraron que los nanocompuestos ZnO-SSPS, con concentraciones por encima de 10 mg/mL equivalentes a 5% de ZnO en la matriz, inhibieron significativamente el crecimiento micelar del *Penicillium expansum* después de siete días de incubación; además, su crecimiento radial se redujo en respuesta a la variación de las concentraciones de las nanopartículas entre 0,1 y 10 mg/mL, evidenciándose que un aumento de la rugosidad y el contenido de sólidos en la matriz ZnO-SSPS, ocasionaba un incremento en el espesor de las películas obtenidas y una disminución del contenido de humedad.

Espitia y colaboradores (Perez *et al.*, 2016), destacaron las principales aplicaciones de las nanopartículas de ZnO al incluirlas en matrices poliméricas, haciendo referencia, entre ellas, a su uso en el envasado de alimentos y considerando, dentro de su funcionalidad, su actividad antimicrobiana y/o antifúngica; además, se mejoraron sus propiedades de embalaje, tales como: resistencia mecánica, propiedades de barrera y estabilidad. Sugirieron que este uso se podría extrapolar a polímeros con base en fuentes renovables biodegradables, dado que no está restringido el uso del ZnO.

Es necesario destacar que la nanotecnología está ingresando fuertemente al sector alimenticio, aportando a las diferentes etapas de la cadena alimentaria, desde la agricultura hasta el procesamiento de los alimentos, incorporando nanomateriales como suplemento o en los empaques (Momin y Joshi, 2015). La adición de nanopartículas a los empaques ha propiciado mejoras en sus propiedades de barrera, frente a diferentes gases, propiedades antimicrobiales y de biodegradabilidad, además de permitir la detección de los gases presentes en el entorno del producto y la obtención de información sobre la calidad de los alimentos, etc. Adicionalmente, se puede minimizar el crecimiento de los micro-organismos contaminantes, reducir el post-procesamiento del alimento y extender el tiempo de vida media del mismo, mejorando la inocuidad alimentaria (Momin y Joshi, 2015 y Cordeiro, 2016). En el caso concreto de las películas para alimentos, se viene trabajando con bio-nanocompositos, usando para ello biopolímeros (Kanmani y Rhim, 2014), almidón de maíz reforzado con talco, para obtener termoplásticos (Lopez *et al.*, 2015), y con mezclas de Na-montmorillonita - glicerol para afectar la biodegradabilidad de la película (Heydari *et al.*, 2013), poniéndole especial atención a la mejora de la biodegradabilidad de las mismas (Zolfi *et al.*, 2014).

3. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental se dividió en dos fases: la primera involucró la síntesis de las nanopartículas (NP) de óxido de cinc (ZnO), su caracterización usando técnicas convencionales que permitieron conocer sus características fisicoquímicas y la evaluación *in vitro* de su actividad antifúngica, sobre los hongos *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, para lo cual se incorporaron en un medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar); esta última actividad permitió determinar la cantidad más adecuada de ZnO-NP a adicionar como nanorelleno a los empaques para lograr un efectivo control del patógeno. Con base en los resultados de los ensayos descritos anteriormente, la segunda fase contempló la inclusión de ZnO-NPs a películas flexible de almidón, elaboradas por los métodos de casting y extrusión, y la determinación de la capacidad antifúngica de las mismas frente a las cepas mencionadas anteriormente. Por último, se estudió el efecto que este material nanoparticulado ocasionaba sobre las propiedades, mecánicas y de barrera, de las películas conformadas por extrusión.

3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON BASE EN ZnO

3.1.1. Reactivos. Para la síntesis de nanopartículas por el método de precipitación controlada, se usaron los reactivos indicados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Lista de reactivos empleados en la obtención del ZnO-NP.

Reactivo	Descripción
Acetato de cinc di-hidratado	99% (Merck)
Etanol absoluto	Merck
Alcohol industrial	96% (Quimpo Ltda.)
Etilenglicol	99.97% (Fisher)
Agua destilada	
Ácido nítrico	65% (Merck)
Ácido acético	99% (Quimpo Ltda.)
Amoniaco en solución	25% (Merck)

3.1.2. Materiales y equipos. Los materiales y equipos que se utilizaron en la síntesis de ZnO-NP se indican en el cuadro 2.

Cuadro 2. Lista de materiales y equipos que se usaron para obtener el ZnO-NP.

Material o equipo	Descripción o marca
Pipetas graduadas	1, 2, 5, 10,25 mL.
Espátula	SCOOPULA.
Vasos de precipitados	25, 50, 100, 250, 500, 600, 1000 mL.
Vidrio reloj	9 cm de diámetro
Equipo de filtración al vacío	BUCHI B-169
Plancha de calentamiento con agitación magnética	CORNING PC-620D
Balanza analítica	XT 220 (220 g / 0,0001)
pH-metro	METROHM 744
Horno	THERMOLYNE
Equipo de alta cizalla	ULTRA-TURRAX T-50
Equipo dosificador	DOSIMAT METROHM 775
Mortero de ágata	Huto Ceratric
Espectrofotómetro IR	PERKIN ELMER, SPECTRUM 100
Equipo de difracción de rayos-x	X dimax 2200
Microscopio electrónico de transmisión	JEOL JEM 12000X
Rejillas para microscopia electrónica	Cobre
Microscopio electrónico de barrido	PHENOM PROX

3.1.3. Síntesis de ZnO-NP por rutas química. La síntesis de nanopartículas de ZnO se realizó usando modificaciones del método denominado precipitación controlada (MPC), empleando solventes con diferente naturaleza fisicoquímica para disolver el acetato de cinc ($Zn(CH_3COO)_2$), compuesto que se utilizó como precursor del catión. El interés central de utilizar los diferentes solventes, para realizar la síntesis del ZnO, fue el de conocer el efecto que cada uno de ellos tenía sobre las características finales del producto obtenido, principalmente morfología y tamaño de la partícula (Montero *et al.*, 2012).

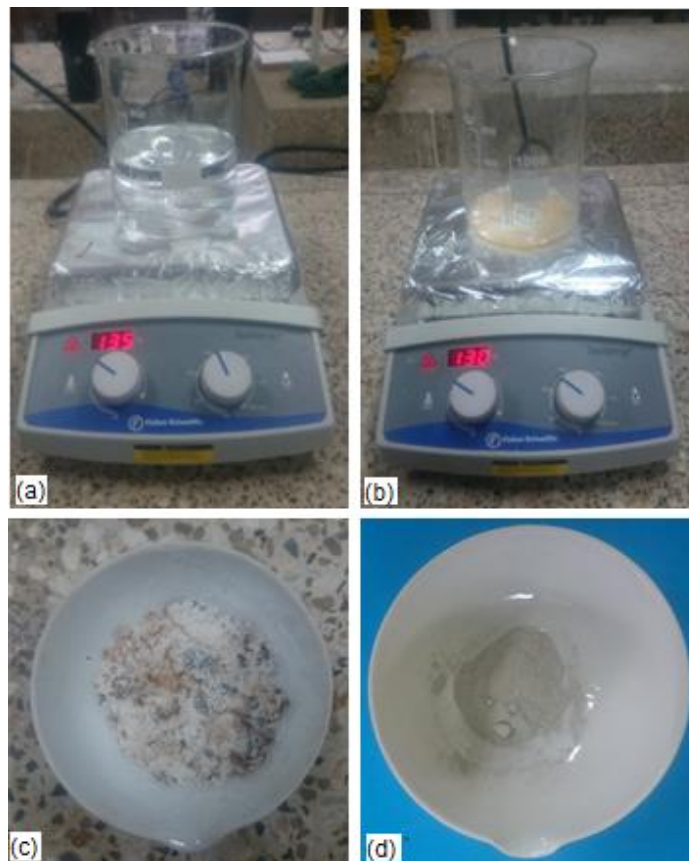
3.1.3.1. Obtención de ZnO-NP: morfología esférica. Aunque en la literatura científica existen propuestas metodológicas para la síntesis de las ZnO-NPs (Montero *et al.*, 2012), en el presente trabajo se realizaron actividades previas de síntesis para estructurar la metodología que permitió obtener las partículas con características predeterminadas. Para el caso concreto de obtener nanopartículas de ZnO con morfología esférica, se disolvió una cantidad adecuada de acetato de cinc en etilenglicol ($C_2H_6O_2$) para obtener una concentración 0.3 M. La mezcla se agitó durante 20 minutos hasta que la solución se tornó completamente transparente garantizando la homogeneidad de la mezcla. La solución resultante se aciduló con ácido nítrico (HNO_3) al 65%, hasta alcanzar un pH de 4 y a esta mezcla se le adicionó hidróxido de amonio (NH_4OH) a una velocidad de 1 mL/min, haciendo uso del dosimat Metrohm 775 (Figura 1a), manteniendo la mezcla en continua agitación (400 rpm) hasta alcanzar un pH de 8. A continuación se agregaron 50 mL de agua destilada al sistema para promover reacciones de hidrólisis en el mismo. Se adicionó nuevamente el agente precipitante (NH_4OH) a la solución hasta alcanzar un pH de 9.5; la suspensión obtenida se sometió a un proceso de secado, en plancha de calentamiento durante 6 horas a $150^\circ C$, para eliminar el líquido (Figura 1b), el producto resultante, de naturaleza viscosa, se sometió a un tratamiento térmico a $300^\circ C$ obteniéndose un sólido café al que se le denominó precalcinado. Este sólido se maceró en un mortero de ágata hasta obtener un polvo muy fino (Figura 1c), que se sometió a un tratamiento térmico a $600^\circ C$, durante 4 horas, usando un horno (Thermolyne), para obtener el óxido de interés (Figura 1d).

Figura 1. Síntesis de las ZnO-NPs morfología esférica: (a). Adición del agente precipitante al sistema etilenglicol – acetato de cinc y agua, (b). Eliminación de la fase líquida, (c). Precalcinado después de macerado, y (d). Polvos de ZnO obtenido después del tratamiento térmico a $600^\circ C$



3.1.3.2. Obtención de ZnO-NP: morfología acicular. La síntesis del óxido de cinc con morfología acicular se realizó utilizando acetato de cinc ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), disuelto en 200 mL de ácido acético (CH_3COOH), usando una cantidad adecuada de precursor para obtener una concentración 0.3 M. La mezcla se agitó durante 20 minutos hasta obtenerse una solución completamente transparente. Luego, se adicionó el hidróxido de amonio (NH_4OH), a una velocidad de 1mL/min, manteniendo la mezcla en continua agitación (400 rpm), hasta alcanzar en la solución un valor de pH de 8,5. La solución obtenida se sometió a un proceso de secado durante 6 horas a 110°C en plancha de calentamiento para eliminar el líquido (Figura 2a). La mezcla viscosa obtenida, (Figura 2b), se sometió a tratamiento térmico a 250°C , durante 2 h en un horno (HACEB). El precalcinado color crema que se obtuvo (Figura 2c) se maceró empleando un mortero de ágata, hasta conseguir un polvo fino el cual se sometió a un tratamiento térmico a 400°C durante 4 horas usando un horno (Termolyne) para finalmente obtener el óxido de cinc (Figura 2d).

Figura 2. Síntesis de las ZnO-NPs con morfología acicular: (a). Proceso de secado del sistema; (b). Eliminación de la fase líquida (c). Precalcinado obtenido y (d). Polvo obtenido que se trató térmicamente a $600^\circ\text{C}/4\text{ h}$.



3.1.4. Caracterización del ZnO-NP. Para la caracterización del óxido de cinc nanoparticulado se emplearon las técnicas convencionales que normalmente se usan para tal fin (Montero *et al.*, 2012).

3.1.4.1. Espectroscopia IR. Es la rama de la espectroscopia que utiliza la parte infrarroja del espectro electromagnético para analizar las muestras de interés. Esta cubre un conjunto de técnicas, siendo la más común la espectroscopia de absorción. Así como las otras técnicas espectroscópicas, esta puede usarse para identificar y cuantificar un compuesto e investigar la composición química de una muestra (He *et al.*, 2011). El espectro infrarrojo correspondiente a una cierta muestra se presenta, usualmente, como absorción, o porcentaje de transmisión, en función de la longitud de onda en (μm) o número de onda en (cm^{-1}) de la radiación. Esta región del espectro electromagnético se encuentra entre los 12 800 y los 10 cm^{-1} , lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm . La espectroscopia IR se fundamenta en la dinámica de las moléculas las cuales tienen unas frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares están cuantizados y presentan unos niveles de energía discretos (modos normales de vibración). La frecuencia vibracional de los átomos, en las moléculas, corresponde a valores de la zona infrarroja del espectro electromagnético. Cuando la frecuencia de radiación que incide sobre una molécula coincide con el valor de uno de sus modos vibracionales, este modo se excita produciendo un cambio en el momento dipolar eléctrico de la molécula, que se evidencia a través de una serie de bandas en el espectro IR (Nafchi *et al.*, 2013) Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies, son algunos ejemplos (Nakamoto, 1997 y Montero *et al.*, 2012).

La muestra a analizar se obtuvo mezclando KBr seco con el sólido sintetizado, en una concentración de 10% aproximadamente. El barrido se realizó entre los 4000 cm^{-1} y 450 cm^{-1} región donde se encuentran las bandas de interés. Los espectros fueron obtenidos con un equipo de espectroscopia infrarroja marca Perkin Elmer, spectrum 100 con transformada de Fourier de la Universidad del Valle.

3.1.4.2. Espectroscopia de absorción UV-Visible. Con esta técnica se determinaron las posibles transiciones electrónicas que pueden ocurrir en el sólido de interés. Del espectro de absorción UV-vis resultante se puede determinar, aproximadamente, el valor de la energía correspondiente al ancho de la banda prohibida entre la banda de valencia y la banda de conducción, que es característica de cada material.

Para obtener los espectros de absorción UV-vis se utilizó un equipó marca Thermo Spectrnic genesys de la Universidad del Cauca. Las muestras de ZnO-NP se dispersaron en agua destilada, en una concentración de 0,1 y 0,2 g/mL y para el análisis se dispusieron en celdas de cuarzo de 1 cm. El barrido se realizó entre los 190 y 750 cm^{-1} .

3.1.4.3. Difracción de rayos X (DRX). Esta técnica se basa en la medida de la dispersión, por parte de un sólido, e interferencia de una radiación electromagnética, altamente energética, que genera unos patrones de difracción los cuales brindan información útil sobre la composición y la estructura cristalina o amorfa de la materia (Montero *et al.*, 2012).

La difracción de rayos X se utiliza para identificar y determinar estructuras cristalinas, analizar soluciones solidas a través de la medida de parámetros de red, medir el tamaño de cristalito, analizar las fases cristalinas presentes en una muestra, y también suministra información sobre la longitud y el ángulo de los enlaces, en las estructuras cristalinas. Normalmente, para identificar las fases presentes en un sólido, se compara la posición e intensidades de los picos de difracción del difractograma experimental, con los patrones de referencia que están registrados en un banco de difractogramas que tiene almacenado el Comité Internacional de rayos x (Powder Diffraction File del Joint Committee on Powder Diffraction Standards, Swartmore USA). Los patrones de difracción de rayos X de las muestras (en polvo) de interés, se registraron utilizando un equipo marca Dimax 2200 de la Universidad del Valle

3.1.4.4. Microscopia electrónica de transmisión (MET). La microscopia electrónica de trasmisión brinda una buena información sobre la naturaleza física y composición química de los sólidos, tanto del “bulk” como de su superficie, permitiendo obtener una mejor información sobre la forma, tamaño, dispersión y conformación de las partículas (a través de los procesos de difracción que experimentan los electrones al atravesar la muestra). Los sólidos a analizar en este trabajo se suspendieron en 2 mL etanol, posteriormente se colocaron en un baño ultrasónico durante una hora. Finalmente, con una micropipeta se depositó una gota de muestra en una de las rejillas de Cu o Al, recubierta con una película formvar. Para observar directamente la muestra, se empleó el microscopio de trasmisión JOEL 1200 EX (a 80 kev) equipo perteneciente a la Universidad del Cauca.

3.1.4.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). La Microscopía Ectrónica de Barrido es una técnica de análisis superficial, que consiste en enfocar sobre una muestra electrodensa (opaca a los electrones) un fino haz de electrones acelerado con energías de excitación entre 0.1 kV y 30 kV. El haz de electrones se desplaza sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que

obedece a una trayectoria de líneas paralelas. La variación morfológica de la muestra entrega diversas señales (electrones secundarios, electrones retrodispersados, emisión de rayos X, etc.) que son recolectadas por distintos detectores; los cuales permiten la observación, caracterización y microanálisis superficial de materiales tanto orgánicos como inorgánicos.

Debido a que la incidencia del haz de electrones, sobre la muestra, puede ocasionar que ésta adquiera una “carga eléctrica superficial” por lo que, previo a la ubicación del sólido en el porta-muestra del microscopio, se debe realizar una metalización del mismo (con oro o plata) o sea depositar sobre la muestra una pequeña película del metal correspondiente. El análisis con esta técnica se realizó empleando un microscopio electrónico de barrido marca Phenom ProX de la Universidad del Valle (U. de los Andes, 2014).

3.1.5. Evaluación de la capacidad antifúngica del ZnO-NP, metodología *in vitro*. Para realizar la evaluación de la actividad antifúngica de las nanopartículas de ZnO sintetizadas, se siguió la siguiente metodología:

3.1.5.1. Aislamiento de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus Niger* a partir de frutas y hortalizas afectadas. Se escogieron frutas y hortalizas que presentaban la afección fúngica (*Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea*), fresa y tomate (Figura 3a) y se lavaron con una solución de hipoclorito al 0,5%. De diferentes partes de las especies infectadas, se tomaron cuadrados de 3 mm de espesor (arriba, abajo y a los lados), teniendo cuidado en cortar la parte enferma del tejido. Posteriormente, cada uno de estos cortes se llevó a una caja de Petri y se le adicionó hipoclorito al 0,5%, dejando actuar durante un minuto para luego enjuagar con agua destilada, proceso que se realizó por triplicado. Por otro lado, se preparó PDA (Patata Dextrosa Agar) que se autoclavó a 121°C por 15 minutos y se sirvió en cajas de Petri (10 cm de diámetro, 20 mL/caja). Luego de gelificado el medio, se realizó la siembra de los cortes que contenían los hongos, utilizando una campana extractora en un medio estéril (Figura 3b), finalmente se llevaron a incubación, a 27°C, por 7 días (Figura 3c) (Quintero, 2012).

Figura 3. Metodología utilizada para el aislamiento de las cepas de interés. (a). Tomate infectado con *Botrytis cinerea*, (b). Campana extractora y (c). Incubadora.

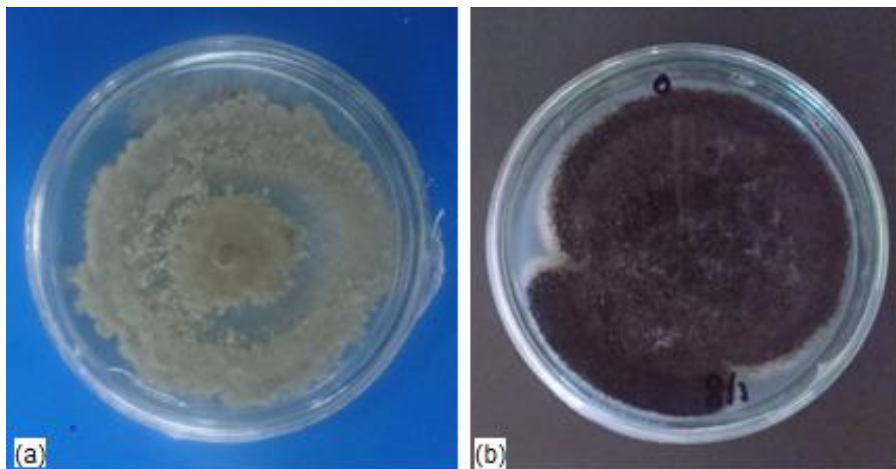


3.1.5.2. Caracterización de las cepas estudiadas (MOAR). Con el propósito de conocer e identificar la estructura de los hongos patógenos de interés, a nivel macro y microscópico, transcurrido el tiempo de incubación se observó la textura, topografía y color que presentaban en el anverso y reverso de las colonias, usando las claves taxonómicas (Avila, 2010). A cada una de las cajas de Petri se les tomó su respectiva impronta, la cual se observó utilizando el Microscopio Óptico de Alta Resolución (MOAR). Esta observación permitió conocer las características microscópicas de cada cepa, tales como: tamaño y forma del conidio, peculiaridades de las hifas y demás características propias de los hongos de interés para este estudio.

3.1.5.3. Método de recuento de esporas. El objetivo de este ensayo fue determinar la cantidad aproximada de esporas, por unidad de volumen, que se debería adicionar como inóculo en las cajas de Petri para realizar los correspondientes ensayos de capacidad antifúngica del ZnO-NP, así como para los empaques activos que se obtuvieron posteriormente. Para obtener los patrones, se tomaron cajas de Petri de 7 días de crecimiento (Figura 4) que contenían al *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, y se les removieron las esporas con la ayuda de un asa redonda. Posteriormente, se depositaron en un Erlenmeyer que contenía 150 mL de una solución de agua destilada esterilizada (ADE), a la que se le había adicionado previamente Tween 80 al 0,1%. De esta suspensión de esporas se tomaron 4 submuestras de 1 mL y se depositaron en tubos con 9 mL de ADE, quedando así preparada la dilución 10^{-1} . Este procedimiento se repitió llevando 1 mL de esta dilución 10^{-1} a tubos con 9 mL de ADE para obtener la dilución 10^{-2} . Esta última resultó apropiada para estimar el número de esporas por mililitro de suspensión, y fue la que se utilizó para realizar todos los ensayos de capacidad antifúngica. Para el recuento de esporas se empleó la cámara de Neubauer, donde se determinó la

cantidad de las mismas sumando el total de esporas presentes en los 4 cuadrantes extremos de la cámara. Para cada submuestra se realizó este procedimiento por triplicado. Para el caso del *Aspergillus niger* se obtuvo una concentración de 12 esporas/ μL , cantidad que se determinó multiplicando el promedio del número de esporas obtenido por el inverso de la dilución empleada para el conteo. De la misma manera se encontró que, para la dilución 10^{-2} , la concentración de esporas de *Botrytis cinerea* era de 15 esporas/ μL . Las concentraciones definidas anteriormente se utilizaron como punto de partida, patrones, para determinar la capacidad antifúngica tanto de las nanopartículas como de las películas activas (Vélez *et al.*, 1997).

Figura 4. Cepas fúngicas, con 7 días de crecimiento. (a). *Botrytis cinerea* y (b). *Aspergillus niger*.



3.1.5.4. Determinación de la capacidad antifúngica de las nanopartículas de ZnO sintetizadas. Para realizar este ensayo se sembró sobre la superficie de una caja de Petri que contenía medio de cultivo PDA, al que previamente se le había adicionado una cierta concentración (6, 9 o 12 mM/L) de nanopartículas de ZnO sintetizadas (esferas o agujas), una alícuota de 10 μL de suspensión de esporas de *Aspergillus niger* o *Botrytis cinerea*, a concentraciones de 12 y 15 esporas/ μL respectivamente. Cada día se tomó un registro fotográfico de las cajas de Petri y sobre él se midió el área de crecimiento del hongo, usando para ello el sistema de análisis "Image pro Analyzer"; hasta completar 8 días de observación. Esta metodología se sustenta en la relación que se puede establecer entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa fúngica y el área de crecimiento del hongo, en la caja de Petri. En el presente caso, el interés fue el de realizar un seguimiento al comportamiento de los hongos de interés frente a la

presencia de las ZnO-NPs, considerando sus 2 morfologías y las diferentes concentraciones que de ellas se adicionaron al medio de cultivo (6, 9 o 12 mM/L).

Para evaluar el efecto de la morfología y la concentración del ZnO-NP incluida en el agar (PDA), para eliminar o inactivar los patógenos de interés, se implementó un diseño factorial 2x2x3, tomando como factores la morfología de la partícula usada, la concentración de ZnO-NP incorporada y la cepa de hongo a inhibir, obteniéndose un total de 12 tratamientos, más el respectivo control, por cepa de hongo (Cuadro 3). Una vez hechos los respectivos montajes *in vitro*, se midió el área de crecimiento de los hongos (cm²/día) con el fin de determinar la capacidad antifúngica del sistema. Los valores de las concentraciones de ZnO-NP empleadas en el ensayo, se definieron con base en datos de la bibliografía consultada y trabajos previos realizados por investigadores sobre otras cepas fúngicas (He *et al*, 2011; Sharma *et al*, 2015).

Cuadro 3. Tratamientos *in vitro* del diseño experimental, empleados para el analizar la capacidad antifúngica de las ZnO-NPs sintetizadas.

Tratamientos	Factores			Variable de respuesta
	Morfología de la partícula	Cepa u hongo a inhibir	Concentración de ZnO-NP (mM/L) incluida al medio.	
1	-	<i>Aspergillus niger</i> .	0	Área de crecimiento del hongo (cm ² /día).
2	-	<i>Brotrytis cinerea</i>	0	
3	Esférica	<i>Aspergillus niger</i> .	6	
4	Esférica	<i>Aspergillus niger</i> .	9	
5	Esférica	<i>Aspergillus niger</i> .	12	
6	Esférica	<i>Brotrytis cinerea</i>	6	
7	Esférica	<i>Brotrytis cinrea</i>	9	
8	Esférica	<i>Brotrytis cinerea</i>	12	
9	Acicular	<i>Aspergillus niger</i> .	6	
10	Acicular	<i>Aspergillus niger</i> .	9	
11	Acicular	<i>Aspergillus niger</i> .	12	
12	Acicular	<i>Brotrytis cinerea</i>	6	
13	Acicular	<i>Brotrytis cinerea</i>	9	
14	Acicular	<i>Brotrytis cinerea</i>	12	

3.2. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS ANTIFÚNGICAS A PARTIR DE ALMIDÓN DE YUCA y ZnO-NP

3.2.1. Materiales. Para obtener las películas flexibles, por los métodos de casting y extrusión-soplado, se utilizó almidón de yuca de la variedad Verónica de Paraguay en su estado nativo, y como plastificante glicerol (grado analítico-pureza del 99.7%, suministrado por DISAN S.A (Cali-Colombia).

3.2.2. Equipos. En el cuadro 4 se indican los equipos que se emplearon para conformar las películas activas con ZnO-NP, empleando los métodos casting y extrusión-soplado

Cuadro 4. Equipos usados para elaborar las películas de TPS con ZnO-NP.

Equipo	Descripción o marca
Extrusor tornillo simple	HAAKE POLYLAB OS RHEOMEX 19/25
Extrusor doble tornillo	THERMO SCIENTIFIC Haake Rheomex OS PTW 16
Horno de convección forzada	MEMMERT
Mezcladora de alta velocidad	KITCHEN AID modelo K45SS
Máquina universal de ensayos	SHIMADZU modelo EZ-L
Cámara climática	BINDER modelo KBF 115
Micrómetro	MITUYOYO
Balanza analítica	RADWAG XA 110/X
Microscopio óptico	NIKON MICROPHOT
Equipo de ensayo de permeabilidad a gases	PERMETM VAC-VBS Gas

3.2.3. Obtención de películas de almidón con ZnO-NP: Método de casting. Con el objetivo de establecer una metodología adecuada para incluir óxido de cinc nanoparticulado en una matriz polimérica y, posteriormente, determinar, de forma cuantitativa el efecto sobre las cepas de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, se conformaron películas de almidón de yuca empleando el método de casting (Castaño *et al.*, 2013), usando dos concentraciones de ZnO-NP: 2 y 2,5 % (w/w), las cuales se establecieron con base en los resultados de los ensayos *in vitro* indicados en el numeral 3.1.5. y que se ajustaron a la dosificación de la película teniendo en cuenta el contenido de almidón en la formulación (Cuadro 5). De acuerdo con estudios previos se sabía que las concentraciones de ZnO-NP que presentaron mejores resultados se encontraban en un rango entre 9 y 12 mMol/L, para las dos morfologías.

Para la elaboración de la películas, nanopartículas de óxido de cinc sintetizadas se dispersaron en 150 mL de agua destilada, empleando agitación y ultrasonido, durante 45 minutos (Castaño *et al.*, 2013). Esta suspensión de ZnO-NPs se utilizó para preparar una solución de almidón de yuca al 4% (w/w), con 1,6% (w/w) de plastificante (glicerol), mezcla que se gelatinizó sometiéndola a condiciones de temperatura y agitación controladas (75°C a 400 rpm), usando para ello una plancha de calentamiento (Figura 5a). La mezcla gelatinizada se esparció sobre moldes de teflón de 12x25 cm (Figura 5b), se dejó enfriar y luego se secó llevándola a una cámara climática Binder (modelo KBF 115), a 40°C durante 12 horas; por último, se retiró la película del molde (Figura 5c) y se almacenó adecuadamente en bolsas de polietileno de cierre hermético para su posterior análisis microbiológico. Para fines comparativos, también se conformaron películas de almidón por casting, a las que no se les agregó el nanorelleno sintetizado, siguiendo las etapas del procedimiento descrito anteriormente.

Cuadro 5. Formulación de las películas de almidón con ZnO-NPs conformadas por el método de casting

Formulación	% (w/w) de ZnO-NP incluido en la película	Equivalencia en mMol/L de ZnO-NP	Morfología de partícula
1*	0	0	-
2	2	9,83	Esférica
3	2,5	12,288	Esférica
5	2	9,83	Acicular
6	2,5	12,288	Acicular

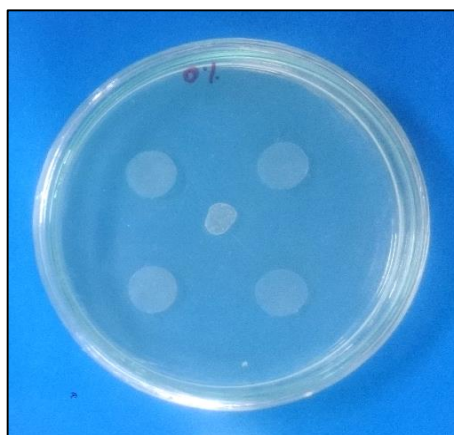
* Película de almidón sin ZnO-NPs.

Figura 5. Procedimiento de casting. (a) Gelatinización de la mezcla almidón-glicerol-ZnO-NP, (b) moldeado de la película y (c) retirado manual de la película del molde.



3.2.4. Evaluación de la capacidad antifúngica in vitro de las películas obtenidas por casting: método de discos. Para este estudio se usó una modificación del método denominado difusión en disco (Rodero, 2006), con el propósito de evaluar la capacidad antifúngica de las películas obtenidas por el método de casting. Para ello se sembró, sobre la superficie de una caja de Petri con medio de cultivo PDA, una alícuota de 10 μL viable de esporas de *Botrytis cinerea* o de *Aspergillus Níger* en una concentración de 15 y 12 esporas/ μL , respectivamente (determinada en el recuento de esporas, numeral 3.1.5.2.). En el cultivo anterior se ubicaron, de forma adecuada, 4 recortes en forma de disco, de 1 cm de diámetro, de cada una de las películas conformadas por casting (Figura 6). Cada 2 días se tomó un registro fotográfico de las cajas de Petri y se midió el área de crecimiento del hongo, empleando el sistema de análisis "Image pro Analyzer", hasta completar un total de 8 días de observación para analizar el comportamiento de los hongos frente a la presencia de ZnO-NPs con morfologías diferentes (esférica y acicular) y en dos concentraciones (2 y 2,5% w/w), incluidas como nanorelleno en las películas de almidón (Cantón et al., 2000).

Figura 6. Evaluación de la actividad antifúngica de los empaques de almidón con ZnO-NPs.



Para estudiar el efecto de la incorporación de las ZnO-NPs en las películas obtenidas por casting se aplicó un diseño factorial 2x2x3 donde se evaluaron los siguientes factores: morfología de la partícula usada, concentración de las ZnO-NPs incorporadas a la película de almidón y la cepa de hongo a inhibir (Cuadro 6). Una vez realizados los montajes disponiendo las películas como se indicó anteriormente (Figura 6), se midió el área de crecimiento de los hongos (cm²/día) con la herramienta óptica mencionada, y mediante un análisis estadístico de datos se determinó cuál de las películas presentaba la mayor actividad antifúngica.

Cuadro 6. Diseño experimental utilizado para determinar la capacidad antifúngica de las películas, conformadas por el método de casting.

Factor	Niveles	Variable de respuesta
Morfología de la partícula de ZnO	Acicular (Ma)	Área de crecimiento del hongo (cm ² /día).
	Esférica (Me)	
Cepas, hongos a inhibir.	<i>Aspergillus niger</i> (An)	
	<i>Botrytis cinerea</i> (Bc)	
Concentración de nano partículas incorporadas a la película.	0% (-)	
	2% (9,83 mMol/L)	
	2,5% (12.288 mMol/L)	

3.2.5. Obtención de películas a partir de almidón y ZnO-NP, método de extrusión-soplado. Para obtener las películas por extrusión soplado se sigue la metodología descrita continuación.

3.2.5.1. Obtención de pellets de almidón termoplástico (TPS) con ZnO-NP. Las nanopartículas de óxido de cinc (ZnO) sintetizadas (agujas y esferas), se dispersaron en glicerol en una concentración de 2% (w/w), porcentaje que se definió teniendo en cuenta resultados previos (numeral 3.2.4.), empleando para ello agitación y ultrasonido durante 20 minutos.

El almidón de yuca se secó en un horno de convección forzada (marca Memmert), a una temperatura de 80°C durante 15 horas. Luego, el almidón seco se mezcló con la suspensión de glicerol y ZnO-NPs, obtenida anteriormente, en una relación almidón/glicerol - ZnO-NP de 70:30, formulaciones que se muestran en el (Cuadro 7). El mezclado se realizó empleando un mezclador de alta velocidad Kitchen Aid (modelo K45SS Figura 7.), durante 10 minutos. Por último, la mezcla resultante fue almacenada a temperatura ambiente (25°C) en un recipiente hermético de polipropileno por 48 horas, para garantizar mayor interrelación entre el almidón y el plastificante.

Figura 7. Secado y acondicionamiento de la mezcla de almidón, glicerol - ZnO-NPs. (a) secado del almidón, (b) mezcla del almidón con el plastificante y el nanorelleno, y (c) almacenamiento de la mezcla.



Cuadro 7. Formulaciones empleadas para la obtención de la película de almidón y ZnO-NPs por el método de extrusión.

	Tratamiento 1 (control)	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Almidón (%)	70	70	70
Glicerol (%)	30	30	30
Morfología de ZnO-NP incorporada.	-	Esférica	Acicular

Una vez acondicionado el almidón, este fue termoplastificado usando un extrusor doble tornillo (marca ThermoScientific modelo Haake Rheomex OS PTW 16) equipado con un barril de un diámetro de 19 mm, un tornillo con una relación de compresión 5:1 y relación L/D de 25 (Figura 8), empleando para ello un dado de cordón y una boquilla con 1 mm de diámetro en su abertura. Una vez obtenida la totalidad de TPS con nanorelleno (ZnO-NPs) en forma de cordón, se pelitizó en fragmentos no superiores a 1 cm de largo y se sometió a secado en un horno de convección forzada (marca Memmert) a 80°C, durante 1 hora; por último, los pellets fueron almacenados en un recipiente hermético. Para la extrusión se empleó una velocidad de tornillo de 50 rpm y un perfil de temperatura de 126,25°C, condiciones que se ajustaron teniendo en cuenta trabajos desarrollados (Delgado *et al.*, 2013 y Arboleda, 2014).

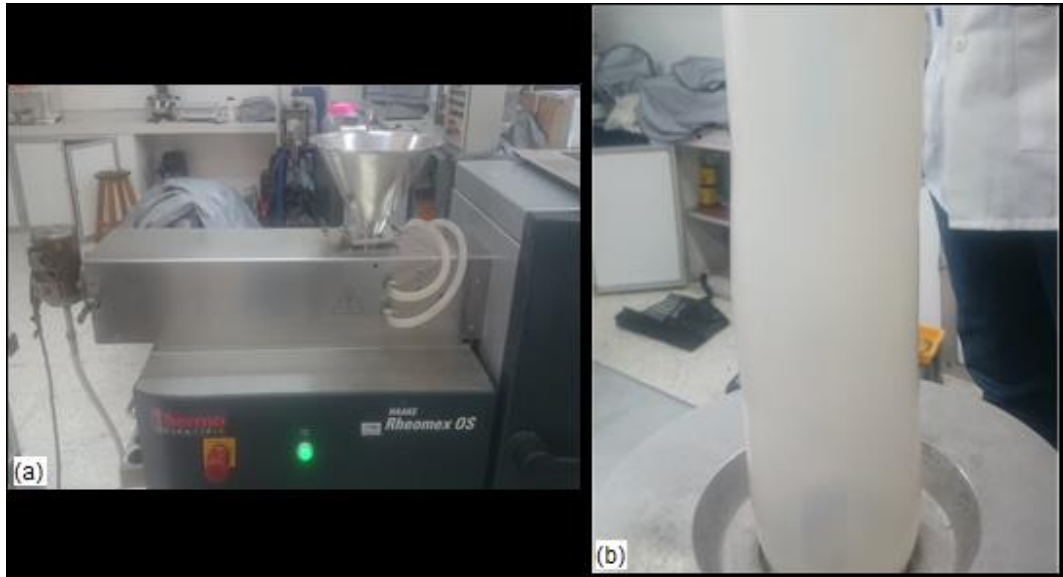
Figura 8. Obtención del almidón termoplástico con ZnO-NPs. (a). Extrusión de la mezcla y obtención del TPS y (b). Secado de los pellets.



3.2.5.2. Obtención de películas a partir de TPS con ZnO-NP Los pellets de TPS, con el nanorelleno (ZnO-NPs), fueron procesados usando un extrusor mono husillo (marca ThermoScientific, modelo Haake Polylap Os) (Figura 9a) empleando un tornillo con una relación de compresión 5:1 y L/D de 25, una velocidad del tornillo

de 35 rpm y a una temperatura promedio de extrusión de 102,4°C. También, se utilizó un dado de soplado con una abertura de 70 μm y un conjunto de rodillos para estandarizar el espesor de la película activa (Arboleda, 2014) (Figura 9b).

Figura 9. Proceso utilizado para obtener películas de TPS con ZnO-NPs. (a) Extrusión de pellets de TPS con ZnO-NPs y (b) Películas conformadas por extrusión-soplado.



Para determinar si se presentaba un efecto por la incorporación de las nanopartículas de óxido de cinc sobre las propiedades de barrera y mecánica por tensión de las películas obtenidas por extrusión que las contenían, se realizó un estudio sistemático para analizar el comportamiento de los tres (3) tratamientos de extrusión tal como se indica en la cuadro 8.

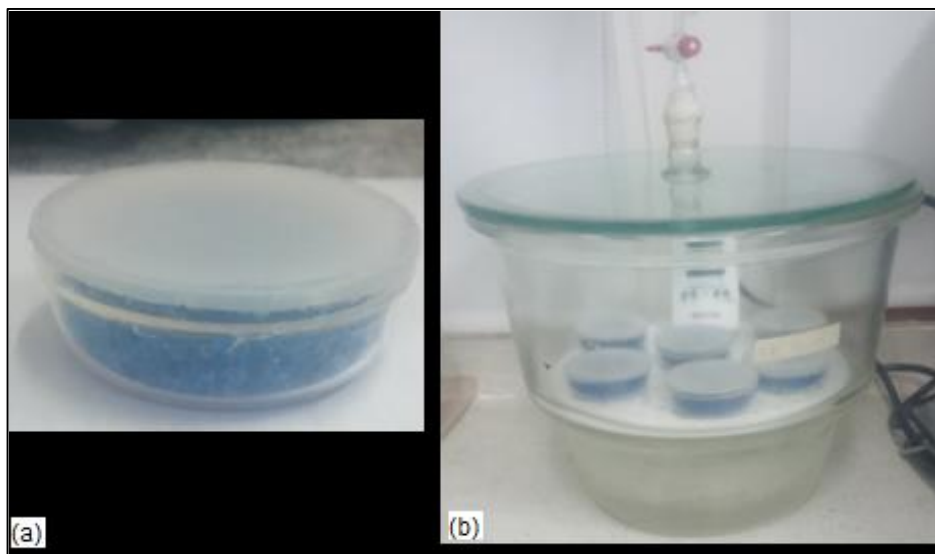
Cuadro 8. Comparación entre las películas que contienen ZnO-NPs esférico o acicular y las películas sin ZnO-NPs.

Tratamientos	Variable de respuesta
Película sin ZnO-NPs, control (PC)	Resistencia máxima a la tensión (MPa), elongación máxima en el punto de ruptura (%), módulo de Young (MPa), PVA ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$), permeabilidad a gases ($\text{moles}/\text{m}^2\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$).
Película con ZnO-NPs morfología esférica (PZnOE).	
Película con ZnO-NPs morfología acicular (PZnOA).	

3.2.6. Evaluación de las propiedades de barrera y mecánicas (por tensión), de las películas obtenidas por extrusión-soplado. Con el propósito de estudiar el efecto del nanorelleno (ZnO-NPs) en el empaque, sobre sus propiedades mecánicas y de barrera, se realizaron los siguientes ensayos.

3.2.6.1. Prueba de permeabilidad a vapor de agua (PVA). Se siguió el procedimiento establecido por la norma ASTM E96 - 10 (2010) donde describe la técnica gravimétrica, empleando como desecante sílica gel. Para ello, las muestras fueron cortadas de forma circular, con un diámetro de 8 cm y por triplicado, y se midió su espesor por quintuplicado usando un micrómetro. Previo a la prueba, las muestras se acondicionaron para el ensayo a la temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y con $50 \pm 10\%$ de humedad relativa (HR), por un periodo de 8 días, en una cámara climática Binder (modelo KBF 115). En una celda de permeación, con abertura circular de $0,00181 \text{ m}^2$, se agregó sílica gel (0 %HR), y su abertura se cubrió con la película (Figura 10a); este montaje se colocó en un recipiente hermético que contenía una solución de cloruro de sodio saturada (68%HR) (Figura 10b). Los montajes se pesaron en una balanza analítica, cada hora, hasta obtener una correlación igual o mayor a 0,95. La permeabilidad de vapor de agua (PVA) se calculó, en unidades de $(\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$, empleando la ecuación 2:

Figura 10. Permeabilidad a vapor de agua (PVA) de las películas de TPS con ZnO-NPs. (a) Montaje realizado en la celda de permeación y (b) recipiente hermético con solución de cloruro de sodio saturada (68 %HR).



$$PVA = \frac{(G/t) * L}{A * P_w * (RH_1 - RH_2)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

dónde: G/t: ganancia de peso en el estado estacionario, g/hora

L: espesor promedio de la película, m.

A: área de permeación, m².

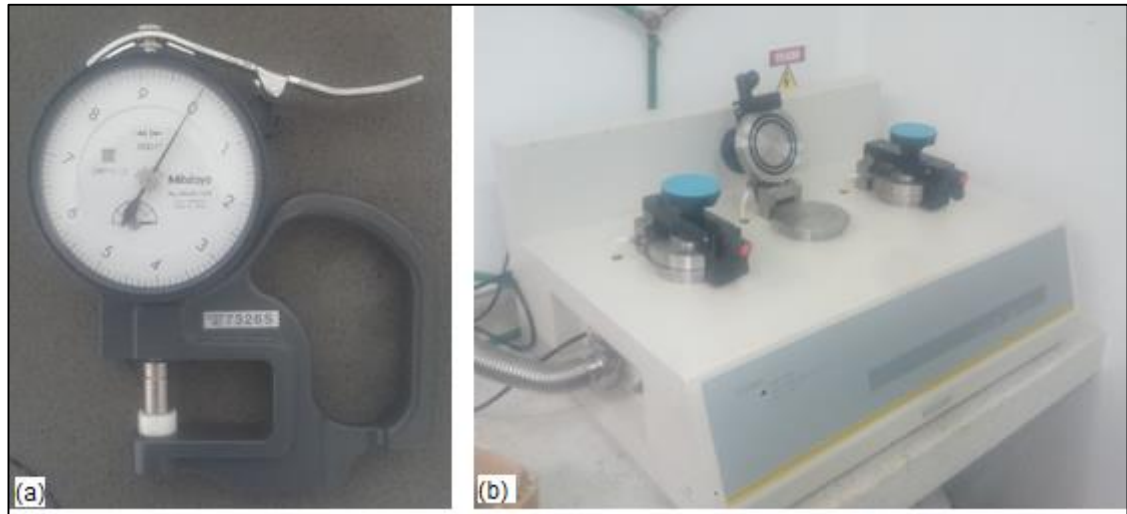
RH₁: humedad relativa fuera de la capsula.

RH₂: humedad relativa al interior de la capsula.

P_w: presión parcial de vapor de agua a la temperatura de ensayo mmHg (1,333 x10⁻² Pa).

3.2.6.2. Prueba de permeabilidad al oxígeno. Se siguió el procedimiento descrito en la norma ASTM D1434-82 (2009) donde se indica el procedimiento a realizar para determinar la propiedad de permeabilidad a los gases de los plásticos, en forma de película. Para el ensayo, se cortaron muestras en forma circular con un diámetro de 80 mm, las cuales se estabilizaron en una cámara climática Binder (modelo KBF 115) a 23 ± 2°C y con 50 ± 10% de humedad relativa, por un periodo de 8 días. Usando un micrómetro especial para determinar espesores (marca mituyoyo (Figura 11a), se midió el espesor de las muestras por quintuplicado. Se tomaron 3 porciones circulares de las películas conformadas y se situaron dentro de una celda de transmisión de gases, formando una semibarrera entre dos cámaras, tal que en la inferior se estableció una presión de vacío menor a 200 Pa. Por otro lado, el gas de ensayo (oxígeno) se suministró a la cámara superior a una presión de 0,1 MPa, la diferencia de presión provocó que el gas permeara a través de la muestra desde la cámara de mayor presión hacia la de baja presión. Para efectos de ensayo fue necesario mantener una temperatura constante a 23 ± 2°C y generar un vacío durante 3 horas. La prueba se llevó a cabo en un equipo de permeabilidad a gases (marca Permetm VAC-VBS gas (Figura 11b.). El software del equipo suministró los valores de permeancia de las películas en cm³/m²*Pa*día y para obtener la permeabilidad de las mismas en unidades de moles/m²*s*Pa se utilizaron las ecuaciones 3, 4 y 5

Figura 11. Materiales y equipos utilizados para realizar el ensayo de permeabilidad al oxígeno. (a) Micrómetro de espesores marca mituyoyo y (b) equipo usado para determinar la permeabilidad a gases (Permetm VAC-VBS gas).



$$\text{Moles gas} = \frac{1}{82,0562 (T + 273,15)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde: T: temperatura de ensayo, °C.

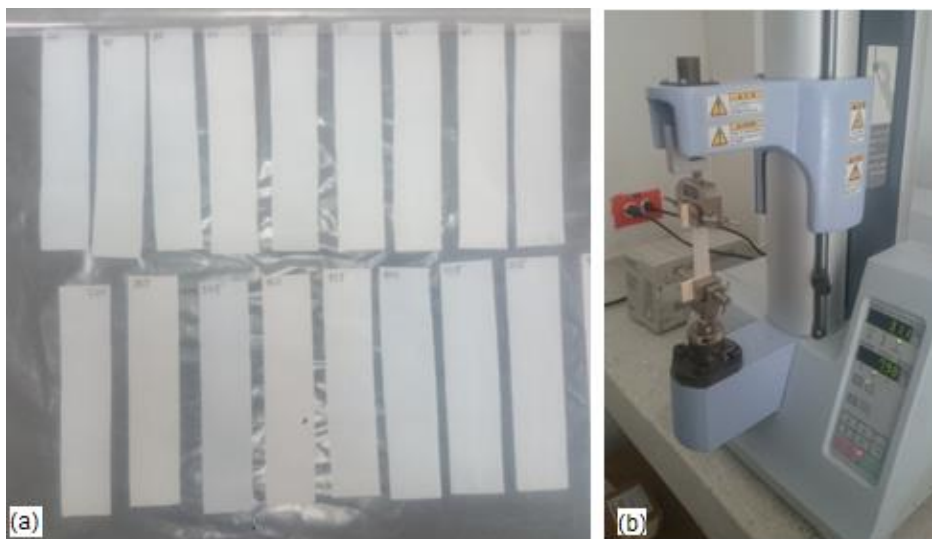
$$\text{Permeancia} \left(\frac{\text{moles}}{\text{m}^2 * \text{s} * \text{Pa}} \right) = \text{Permeancia} \left(\frac{\text{cm}^3}{\text{m}^2 * \text{s} * \text{Pa}} \right) * \left(\frac{\text{moles de gas}}{86400} \right) \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$\text{permeabilidad} = \text{permeancia} \left(\frac{\text{moles}}{\text{m}^2 * \text{s} * \text{Pa}} \right) * \text{expesor (m)} \quad (\text{Ecuación 5})$$

3.2.6.3. Propiedades mecánicas de tensión A las películas de almidón y ZnO-NP, obtenidas por extrusión-soplado se les midieron sus propiedades mecánicas: resistencia máxima a la tensión (MPa), módulo de elasticidad (MPa) y elongación máxima (%), al octavo día de haber sido conformadas, tiempo durante el cual estuvieron almacenadas en condiciones de humedad y temperatura controladas ($50 \pm 10\%$ de HR y $23 \pm 2^\circ\text{C}$) dentro de una cámara climática Binder (modelo KBF 115). Para realizar las pruebas mecánicas se empleó una máquina universal de ensayos

(Shimadzu, modelo EZ-L (Figura 12b)), siguiendo las indicaciones mencionadas en la norma ASTM D-882-10 (2010). La prueba de tensión se hizo usando una celda de 500 N, a una velocidad de cabezal de 25 mm/min y a una velocidad de recolección de datos de 500 puntos/s, con una distancia entre mordazas de 50 mm. Se cortaron cinco probetas por triplicado, en sentido longitudinal y trasversal, de cada una de las películas que tenían las diferentes dosificaciones empleadas, obtenidas por extrusión-soplado. Las muestras se dispusieron en dimensiones de 90 mm de largo y 20 mm de ancho (Figura 12a) y sus espesores fueron medidos utilizando un micrómetro Mituyoyo, tomando 5 medidas por cada probeta.

Figura 12. Materiales y equipos utilizados para las propiedades mecánicas de tensión. (a) Probetas cortadas y (b) disposición del equipo y la muestra para la realización de la prueba de resistencia máxima a la tensión en la maquina universal de ensayos (Shimadzu, modelo EZ-L).



3.2.7. Evaluación de la capacidad antifúngica in vitro de las películas obtenidas por extrusión-soplado: método de discos. Para evaluar la capacidad antifúngica de las películas obtenidas por extrusión-soplado, se usó una modificación del método de difusión en disco, metodología descrita en el numeral 3.2.4., usando, en el presente caso, recortes de 1 cm de diámetro de las películas con ZnO-NPs conformadas por el método de extrusión-soplado.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Mediante la utilización del software SPSS, Inc. Versión 22, se realizaron las diferentes evaluaciones estadísticas de las variables de respuesta consideradas en los diseños experimentales planteados. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de 0,05. Mediante pruebas de comparaciones múltiples, se determinaron las diferencias entre los distintos tratamientos empleados en los diseños de los ensayos de interés.

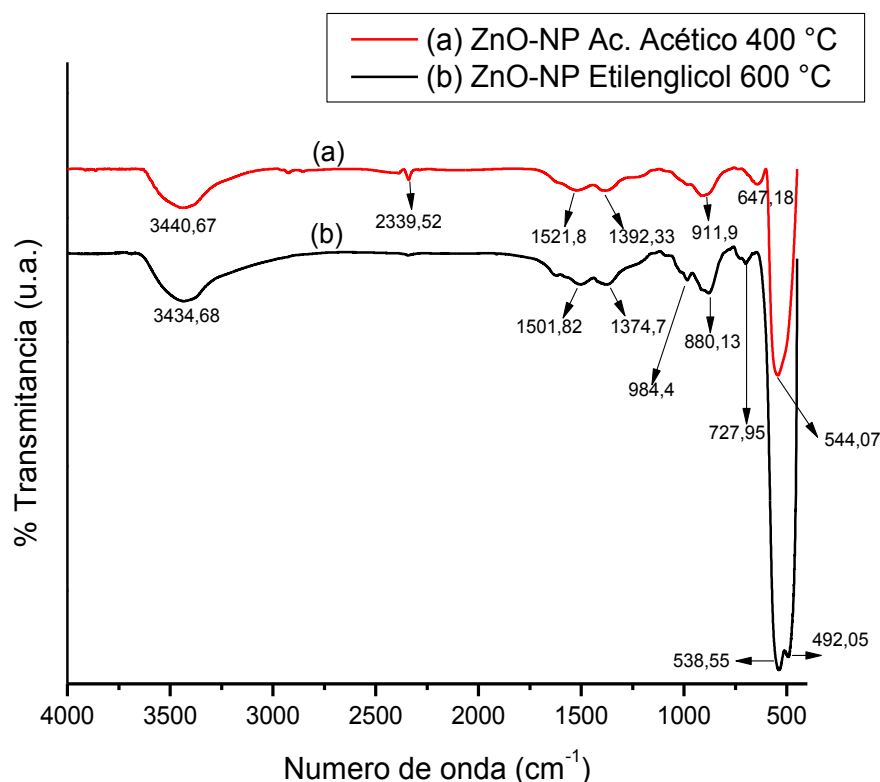
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS ZnO-NP SINTETIZADAS POR RUTAS QUÍMICAS.

Los polvos de óxido de cinc sintetizados en este trabajo fueron caracterizados usando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), para determinar los grupos funcionales presentes en los sólidos y, principalmente, las bandas características del ZnO; espectroscopia de absorción UV-Visible, para conocer las transiciones electrónicas que podrían ocurrir en los sólidos de interés; difracción de rayos X (DRX) para determinar las fases cristalinas presentes en las muestra sintetizadas y, por último, se utilizó Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) para conocer el tamaño, grado de aglomeración y morfología de las partículas.

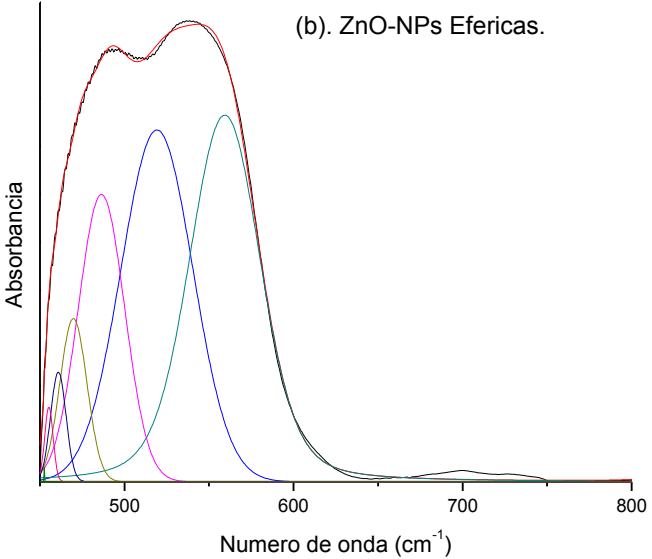
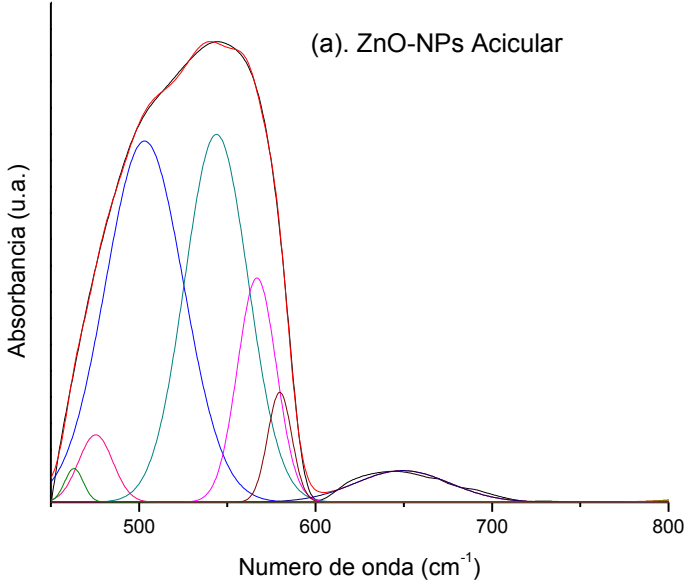
4.1.1. Espectroscopia IR de las nanopartículas de ZnO sintetizadas. En la figura 13 se muestran los espectros IR correspondientes a las muestras de ZnO-NPs obtenidas por rutas químicas, utilizando como solventes de síntesis ácido acético (CH_3COOH) (Figura 13a) y etilenglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) (Figura 13b), las cuales fueron sometidas a tratamiento térmico a 400 y 600 °C, respectivamente. En los dos espectros, las bandas que se observan a $\sim 3441 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 13a) y $\sim 3435 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 13b) se podrían asignar a los modos vibracionales de tensión de los enlaces O-H y N-H correspondientes a los grupos funcionales hidroxilos (OH^-), provenientes del agua absorbida por la muestra, y los producidos por la presencia de NH_4OH y/o del HNO_3 en el sistema (Sharma *et al*, 2015). También se evidencian otras bandas alrededor de $\sim 1392 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1522 \text{ cm}^{-1}$, concretamente para las ZnO-NPs sintetizadas con ácido acético (Figura 13a) y en $\sim 1375 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1502 \text{ cm}^{-1}$ para las partículas sintetizadas en etilenglicol (Figura 13b), bandas que se pueden asociar a los modos vibracionales de tensión asimétrico y simétrico del grupo carboxilo (COO^-) proveniente del precursor de cinc. Una banda intensa, alrededor de 540 cm^{-1} , está presente en los dos espectros y puede corresponder al modo vibracional de tensión del grupo funcional Zn-O, característico del óxido de cinc (ZnO) (Rodríguez, 1999) Otras bandas son evidentes, como por ejemplo la ubicada a $\sim 2340 \text{ cm}^{-1}$ que correspondería al CO_2 adsorbido del medio ambiente por la muestra, durante su manipulación (Rodríguez, 1999).

Figura 13. Espectros IR correspondientes a muestras sólidas sintetizadas con (a). Solvente ácido acético y (b). Solvente etilenglicol, tratadas térmicamente a 400 y 600 °C respectivamente.



Para analizar con más cuidado los espectros IR obtenidos de las muestras sólidas sintetizadas, figura 13, se tomó la región comprendida entre 800 y 400 cm⁻¹, donde se encuentran las bandas más importantes asociadas a los enlaces que forma el Zn, y se deconvolucionó utilizando el software FITIK. En la Figura 14 se muestran las deconvoluciones del espectro IR, entre 800 y 400 cm⁻¹, correspondientes a los sólidos sintetizados usando solvente ácido acético (Figura 14a) y etilenglicol (Figura 14b), respectivamente. Observando las deconvoluciones de los espectros IR, entre 400 y 800 cm⁻¹, se pueden vislumbrar diferencias entre ellas debido al uso de diferentes solventes de síntesis, poniendo en evidencia diferencias en la estructura superficial y grupos químicos ligados a la misma (Purnnoose *et al.*, 2014) lo que hace presagiar diferencias en las funcionalidades de estas nanopartículas.

Figura 14. Deconvolución del espectro IR entre 800 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , correspondientes a muestras sólidas sintetizadas empleando los solventes (a). Ácido acético y (b). Etilenglicol.



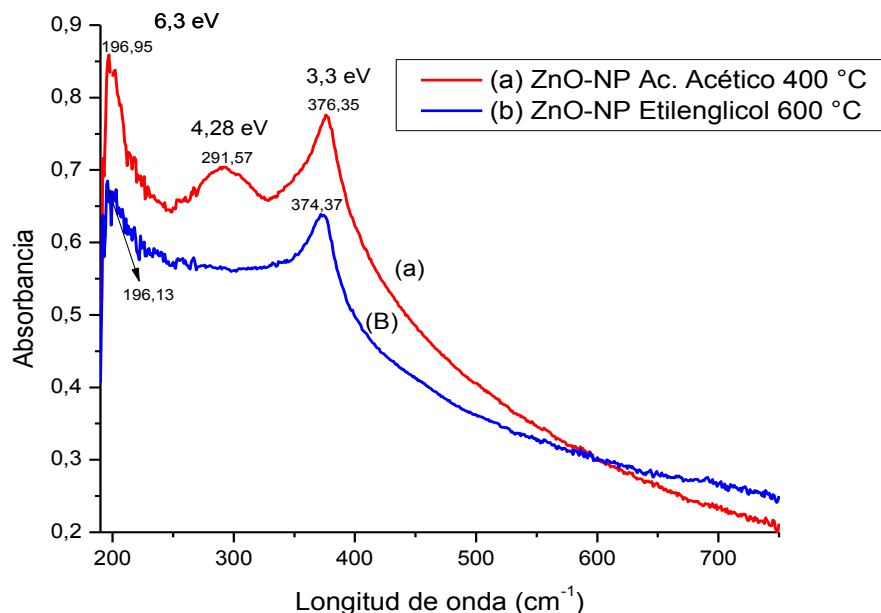
En el cuadro 9 se indica la asignación de bandas a los espectros IR, deconvolucionados, de la figura 14, los datos de esta tabla indican que el sistema es muy dinámico y que este proceso favorece la consolidación de los enlaces Zn-O

Cuadro 9. Bandas representativas de los espectros IR correspondiente a sólidos sintetizados con solvente ácido acético y etilenglicol.

Bandas (cm ⁻¹).	Asignación de grupos funcionales a las bandas.	Bandas (cm ⁻¹).
ZnO acicular		ZnO esférico
580	???	-
566	???	-
-	???	560
543	ν(ZnO)	-
-		518
502		-
475	Enlace (Zn-O)	-
463		-
-		486
-		469
-		460
-	P _t (NH ₃)	455

4.1.2. Caracterización de las ZnO-NPs con Espectroscopia de absorción UV-Visible. El efecto del solvente de síntesis sobre las transiciones electrónicas que presenta normalmente el ZnO, concretamente sobre el valor de energía del ancho de la banda prohibida (“band-gap”), fue investigado usando espectroscopia de absorción UV-vis. La Figura 15 muestra los espectros de absorción, a temperatura ambiente, correspondientes a las ZnO-NPs sintetizadas en ácido acético (Figura 15a) y etilenglicol (Figura 15b). Ellas presentan una banda característica de absorción alrededor de 375 nm, correspondientes a valores de energía de 3,29 eV (para muestras sintetizadas en ácido acético) y 3,33 eV (sólidos sintetizados en etilenglicol que coinciden con los obtenidos en el trabajo de Khorsand y colaboradores (Khorsand *et al*, 2016), y que se asocia al proceso de transferencia de carga de la banda de valencia a la banda de conducción del ZnO o sea al ancho de su banda prohibida de energía.

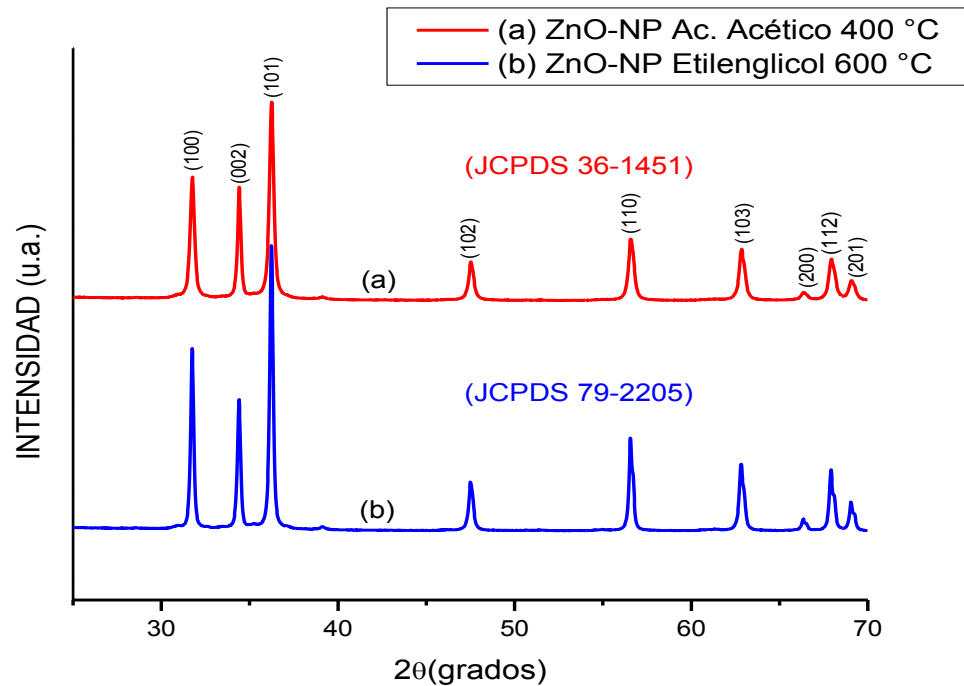
Figura 15. Espectros UV-Visible correspondientes a muestras de ZnO sintetizadas en (a). Ácido acético (acicular) y (b). Etilenglicol (esférico).



Hay otras bandas que aparecen en los espectros UV-Vis de las muestras de ZnO-NPs sintetizadas: una ubicada a $\sim 197 \text{ cm}^{-1}$ ($E = hc/\lambda = 6,3 \text{ eV}$), que es evidente en los espectros independiente del solvente de síntesis utilizado, mientras que la ubicada a $\sim 290 \text{ cm}^{-1}$ ($E = 4,28 \text{ eV}$) solo aparece en el espectro de la muestra sintetizada en ácido acético.

4.1.3. Caracterización de las ZnO-NPs con difracción de rayos X (DRX). Los difractogramas de rayos X, de los sólidos de ZnO sintetizados, se muestran en la figura 16. Los picos de difracción que aparecen en los difractogramas de la figura 16, correspondientes a las ZnO-NPs sintetizadas en solvente ácido acético (CH_3COOH) (Figura 16a) y etilenglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) (Figura 16b), son característicos de la fase cristalina hexagonal tipo wurtzita del ZnO (JCPDS 79-2205) donde se destacan los picos correspondientes a la familia de planos cristalinos (100), (002) y (101), y con menor intensidad los de los planos (102), (110), (103), (200), (112) y (201). Lo más evidente entre los dos difractogramas es la similitud en la intensidad de los picos (100) y (002) en el correspondiente a las ZnO-NPs sintetizadas en ácido acético (acicular) lo que hace presagiar diferencias en la morfología de las nanopartículas.

Figura 16. Difractogramas de rayos X correspondientes a muestras sólidas obtenidas con: (a). Ácido acético y (b) Etilenglicol.

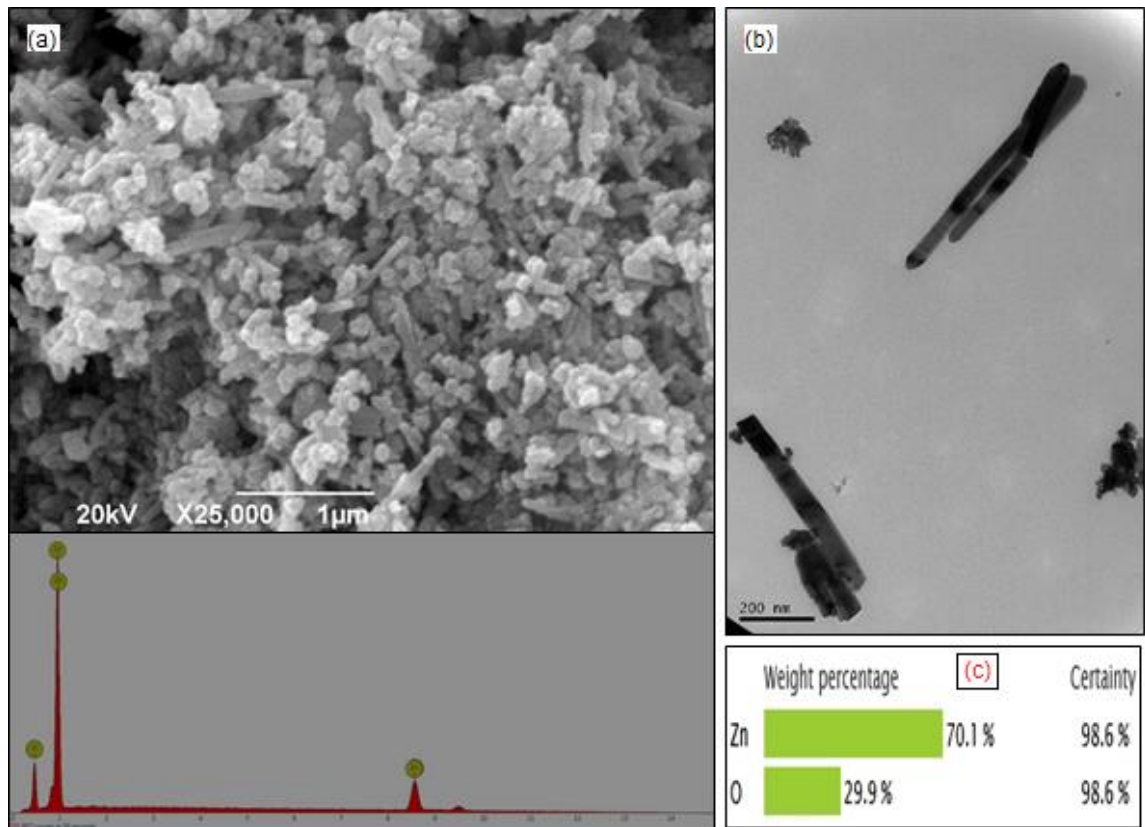


4.1.4. Análisis de las ZnO-NPs sintetizadas usando Microscopia Electronica de Barrido (SEM) y Microscopia Electrónica de transmisión (MET). Para determinar el tamaño y la morfología de las partículas, así como el efecto de los diferentes parámetros de síntesis considerados y analizados sobre las características del producto final, se utilizó microscopia electrónica de barrido y de transmisión.

En la figura 17a se muestra una micrografía de barrido (magnificación 25000x) de las ZnO-NPs obtenidas usando ácido acético, como solvente de síntesis, y tratadas térmicamente a 400 °C. En ella se observan partículas que presentan una morfología predominantemente tipo varilla o acicular, dispuestas arbitrariamente, con una longitud de 500 nm y un diámetro de 40 nm, aproximadamente, tal como lo indica la fotografía de la misma muestra obtenida con MET (Figura 17b); también, se evidencian aglomerados de diferente tamaño, compuestos por estructuras primarias más pequeñas de forma esférica. Este resultado lleva a considerar que durante el proceso de síntesis las partículas esféricas se pudieron agregar de manera ordenada para conformar las varillas o agujas que predominan en la muestra, proceso que ha sido observado en otros sistemas como en la formación

de partículas de sílice (SiO_2) (Bogush, 1991). Por otro lado, las muestras de ZnO-NPs sintetizadas en etilenglicol, y calcinadas a 600 °C, presentaron partículas esféricas aglomeradas, con un tamaño uniforme (Figura 17a), de ~40 nm (Figura 17b). Los espectros EDS de las dos muestras, figuras 17c y 18c, indican la presencia de sólo los elementos cinc y oxígeno en los polvos sintetizados de ZnO-NPs, donde los porcentajes de los mismos indican una menor presencia de oxígeno, poniendo en evidencia el carácter no estequiométrico del ZnO sintetizado y la existencia de vacancias de oxígeno, en alta concentración, en las ZnO-NPs obtenidas. Los resultados del análisis de EDS confirman la pureza química de las ZnO-NPs, después de la calcinación, reiterando los resultados de espectroscopia IR (Figura 13) y DRX (Figura 16).

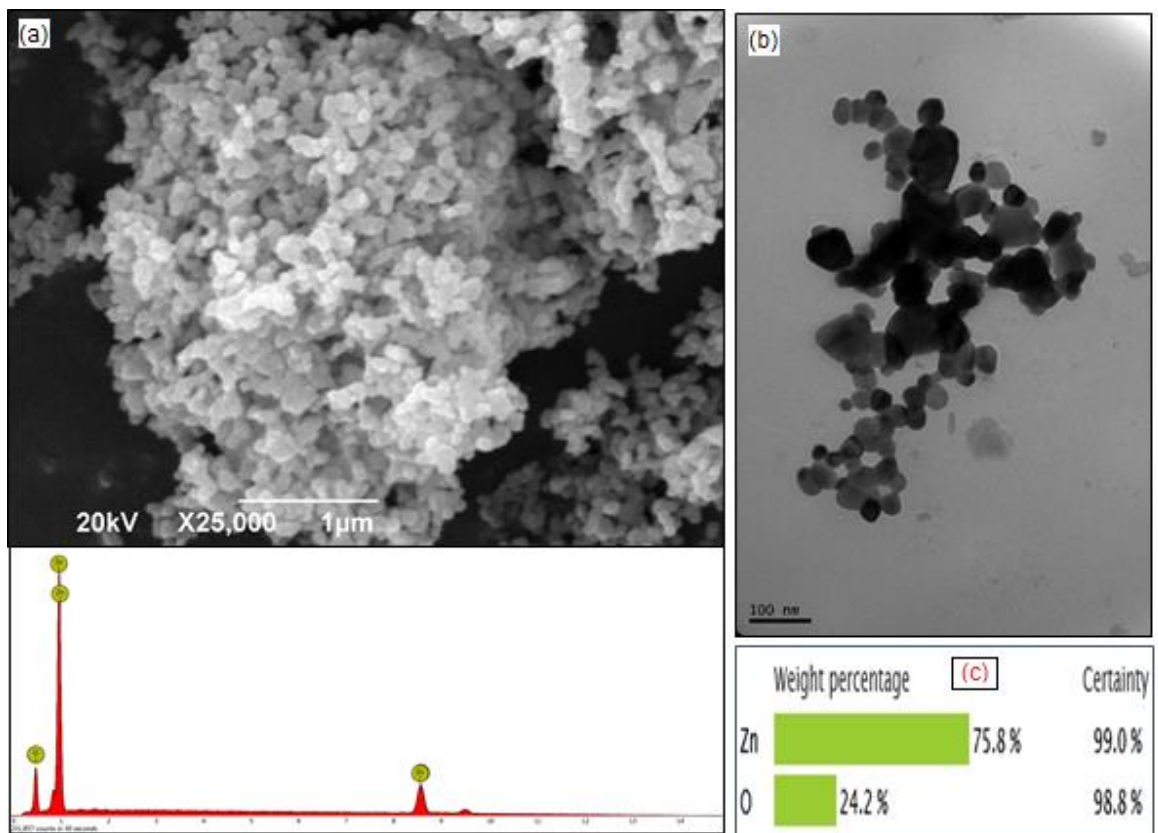
Figura 17. Micrografías obtenidas con (a). SEM y (b). MET y (c). Resultados de análisis químico elemental de las ZnO-NPs sintetizados en solvente ácido acético.



En las imágenes de MET mostradas en la figuras 17 y 18, obtenidas para las ZnO-NPs sintetizadas en ácido acético y etilenglicol, se destacan las morfologías predominantes en cada una de las muestras. Las ZnO-NPs obtenidas en ácido acético (Figura 17b) mostraron, preferencialmente, una morfología tipo barra o

aguja, con un tamaño medio de 500 nm de longitud y 40 nm de diámetro. Por otro lado, las nanopartículas de ZnO sintetizadas en etilenglicol (Figura 18b) presentaron una distribución bastante uniforme, con forma esferoidal, con un tamaño medio menor a 40 nm. Las fotografías 17 y 18 ponen en evidencia el cambio en la morfología de las partículas al variar la naturaleza del solvente utilizado para sintetizar, reiterando resultados previos enunciados en la literatura (Montero *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015; Vargas, 2016).

Figura 18. Micrografías obtenidas con (a). SEM y (b). MET y (c). Resultados de análisis químico elemental de las ZnO-NPs sintetizados en solvente etilenglicol.

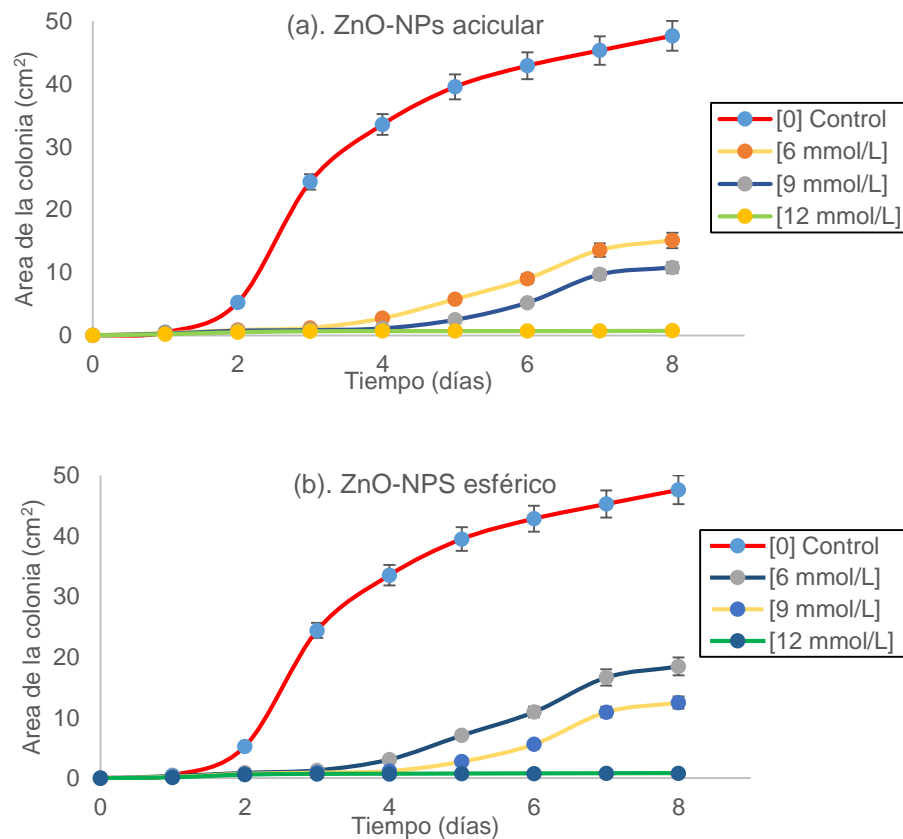


4.2.EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS ZnO-NPs: METODOLOGÍA *in vitro*.

4.2.1. Efecto del tratamiento con ZnO-NPs sobre cepas de *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea*. En las Figuras 19 y 20 se aprecian las distintas etapas de crecimiento del *Aspergillus niger*, comparando el comportamiento de la cepa control (sin tratamiento) con el de las cepas sometidas a tratamientos con diferentes

concentraciones de ZnO-NPs (6, 9 y 12 mmol/L), usando partículas con morfología acicular (Figura 19a) y esférica (Figura 19b). Como se observa en la figura 18, el periodo de latencia (tomado como el tiempo de adaptación o transición de los microorganismos a una nueva condición) para la cepa control duró un día mientras que para las cepas tratadas con las ZnO-NPs fue mayor a 3 días, para la concentración de 9 mmol/L, y 4 días para la de 12 mmol/L, comportamiento de crecimiento del hongo que fue evidente para las dos morfologías de ZnO-NPs estudiadas. En los tratamientos con ZnO-NPs evaluados, el mayor grado de crecimiento se presentó en las placas tratadas con una concentración 6 mmol/L, tanto para la morfología acicular como esférica, crecimiento que fue menor al que presenta el testigo (control). La reducción o inhibición en el crecimiento del hongo fue más evidente al aumentar la concentración de ZnO-NPs en el medio PDA, tal como se observa en las figuras 19a y 19b para los tratamientos con concentraciones 9 y 12 mmol/L de óxido.

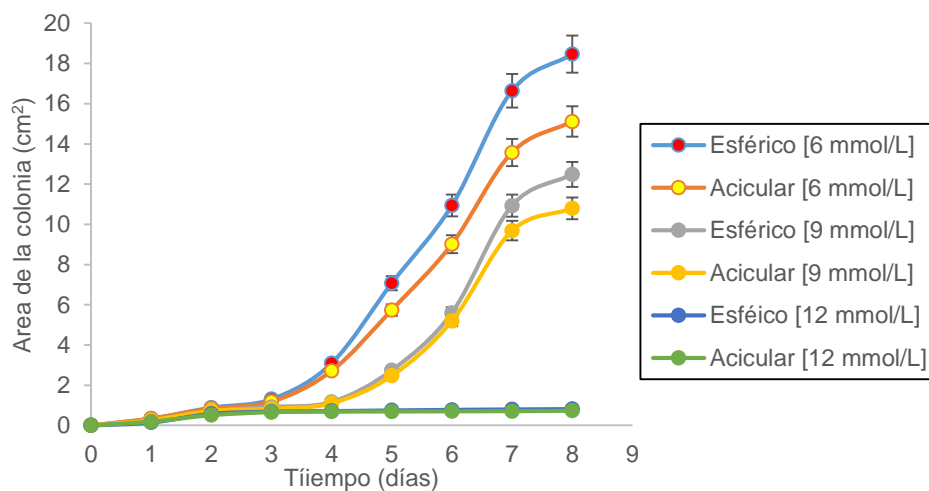
Figura 19. Curvas de crecimiento de *Aspergillus niger* sometido al tratamiento con: (a). ZnO-NP acicular y (b). ZnO-NP esférico, para diferentes concentraciones de óxido.



Nota: Las barras verticales indican la desviación estándar de las medidas.

En la figura 20 se muestra la comparación de la acción de los tratamientos con las ZnO-NPs sintetizadas, y que presentaban las dos morfologías de interés (esferoidal y acicular), sobre el crecimiento del *Aspergillus niger*. Estas curvas muestran, de manera evidente, que para las tres concentraciones evaluadas, la morfología del óxido que presentó mejor efecto, mayor reducción del crecimiento de la colonia, fue la acicular, o sea aquellas nanopartículas que se obtuvieron utilizando como solvente ácido acético.

Figura 20. Curvas de crecimiento de *Aspergillus niger* donde se comparan los tratamientos con ZnO-NPs que presentaban morfología acicular o esférica.



Nota: Las barras verticales son la desviación estándar.

La variable considerada en el diseño experimental, para valorar el efecto de las ZnO-NPs sobre cada una de las cepas, fue el área de crecimiento de la colonia (en cm^2) registrada para cada uno de los días de evaluación. De las curvas de crecimiento construidas (Figura 19 y 20) se pudieron obtener otras cantidades de interés como: inhibición del crecimiento (%), tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$) y duración de la fase lineal de crecimiento (días), las cuales se consideraron para realizar un mejor análisis de los ensayos realizados para determinar la capacidad antifúngica de las ZnO-NPs sintetizadas. En el cuadro 10, se muestra la tasa de crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, para cada tratamiento, la cual indica la rapidez de crecimiento del hongo en su fase lineal de crecimiento o sea en la etapa donde el hongo crece a pleno rendimiento. El valor de este parámetro se obtuvo a partir de los gráficos área-tiempo (Figura 19 y 20), considerando la zona lineal que existía en cada una de las curvas, a la cual se le calculó su pendiente; también se determinó la duración de este comportamiento lineal, en días, para cada uno de los tratamientos (Cuadro 10).

De los valores del cuadro 10 se puede concluir que al aumentar la concentración de ZnO-NPs, en el medio de cultivo, la tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$) del *Aspergillus niger* disminuyó, evidenciándose una mayor reducción de la velocidad de crecimiento con las partículas de morfología acicular; este comportamiento también se presentó en la duración de la fase lineal de crecimiento del hongo, reduciéndose con el aumento de la concentración de óxido en el PDA, encontrándose que para los tratamientos más eficientes en inhibición del crecimiento del hongo (12 mmol/L, morfología acicular y esférica.) presentaron una duración de 2 días, en comparación con los 4 días del control, lo que indica una significativa afectación de esta concentración de ZnO-NPs durante la fase de mayor crecimiento del hongo. El cuadro 10 también indica los datos de inhibición de crecimiento del hongo con relación al testigo, cantidad expresada en porcentaje y calculada tomando el dato de área del último día del ensayo (día 8), razón entre el área del hongo tratado y el área del sin tratar. Los valores obtenidos de este parámetro (Cuadro 10) muestran lo eficaz que son ZnO-NPs en la inhibición del crecimiento del *Aspergillus niger*, lográndose una reducción de más del 60 % en el crecimiento, con la concentración más baja de nanopartículas (6 mmol/L). Este efecto de inhibición aumentó al incrementarse la dosis de nanopartículas en el medio (Cuadro 10), alcanzándose una inhibición casi completa con la concentración de 12 mmol/L; además se observó que fueron las ZnO-NPs con morfología acicular las que presentaron un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento del *A. niger*.

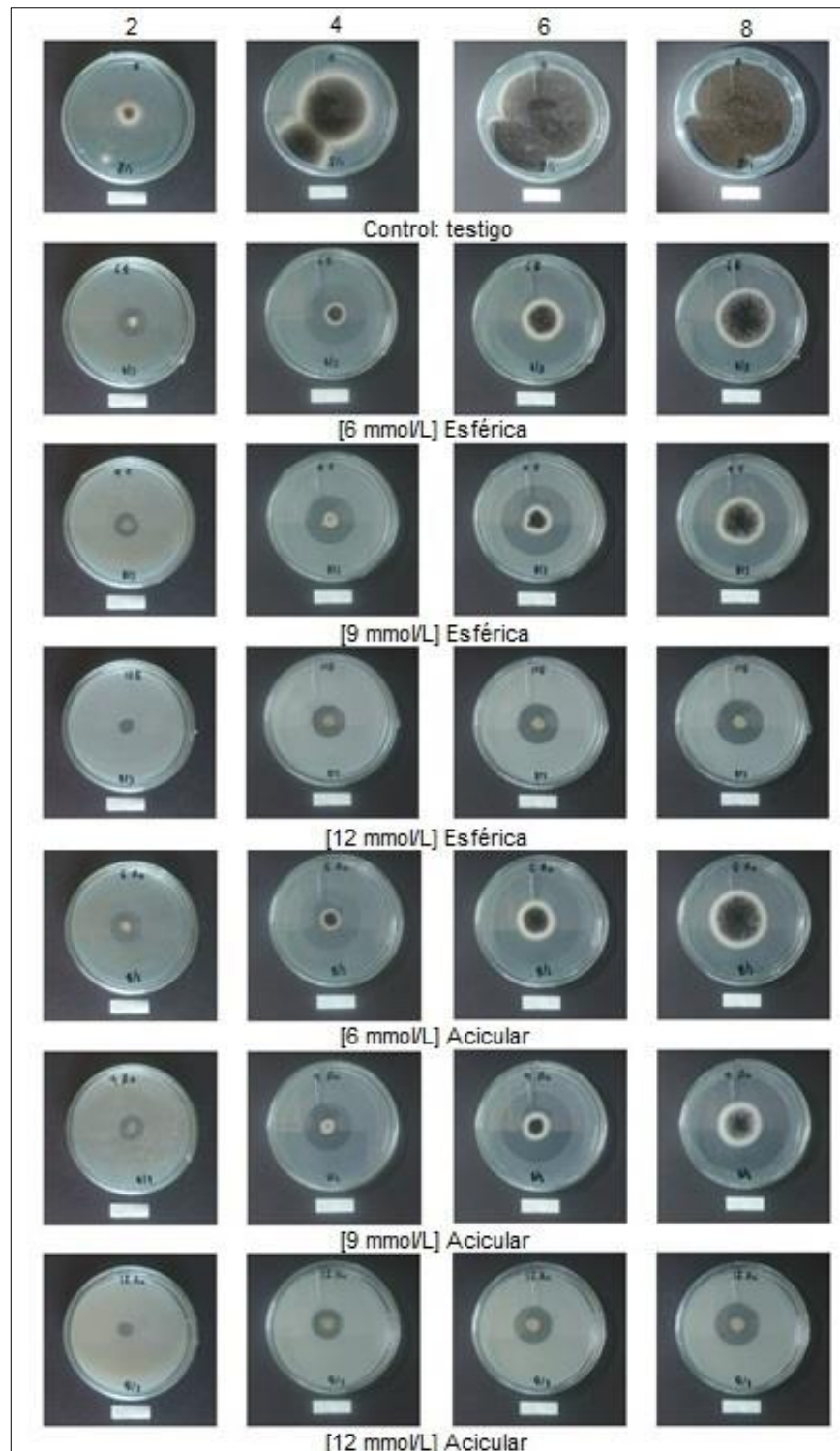
Cuadro 10. Valores de los parámetros relacionados con el crecimiento del *Aspergillus niger* considerando al hongo normal, testigo, así como de los obtenidos al tratarlo con diferentes concentraciones de ZnO-NPs.

Cepa: <i>Aspergillus niger</i> .				
Tratamiento: concentración y morfología usada.	Crecimiento de la colonia día 8 (cm^2)	Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$)	Duración fase lineal (días)	Inhibición del crecimiento (%)
Testigo (Control)	47,623	10,635	4	-
Esférica (6 mmol/L)	18,456	3,2867	3	61,24
Acicular (6 mmol/L)	15,107	2,6520	3	68,28
Esférica (9 mmol/L)	12,485	2,2128	2	73,78
Acicular (9 mmol/L)	10,789	2,0463	2	77,35
Esférica (12 mmol/L)	0,814	0,2895	2	98,29
Acicular (12 mmol/L)	0,734	0,2563	2	98,46

En la figura 21 se observa de manera más gráfica el efecto que las ZnO-NPs sintetizadas, con sus dos morfologías, sobre el crecimiento de la cepa *Aspergillus niger*. Es evidente en las fotografías cómo, a medida que se aumentó la concentración de ZnO-NPs en el medio de cultivo, disminuyó el área del patógeno en la caja de Petri, inhibición del crecimiento que fue más notable en las muestras tratadas con una concentración 12 mmol/L de nanopartículas, lográndose una inhibición del hongo del 98,46 y 98,29% con las partículas de ZnO de morfología acicular y esférica, respectivamente (Cuadro 10). En la Figura 21 también se puede apreciar el halo de inhibición que generó el hongo, como respuesta a la presencia del óxido de cinc en el medio, halo que disminuyó de tamaño a medida que se aumentó la concentración de ZnO-NPs en los tratamientos pero que, con el paso de los días, aumentó su tamaño. Hay que destacar que dichos halos de inhibición presentaron menor tamaño en los tratamientos con partículas aciculares (Ver figura 21).

Como se indica en los fundamentos de la microbiología, una de las formas de controlar o inhibir una cepa fúngica es afectando o retardando su reproducción, sexual y/o asexual. El *Aspergillus niger*, hongo de interés para este trabajo, presenta los dos tipos de reproducción. El color negro que muestra el hongo (Figura 21) es debido a las conidias o esporas que existen en la superficie del cultivo, las cuales son oscuras y con un diámetro hasta de 4 μm ; estas conidias son las encargadas de la reproducción asexual del hongo. La otra forma de reproducción, la sexual, es de gran importancia para los estudios taxonómicos, fisiológicos y de reproducción pero no para abordar el estudio de las enfermedades causadas por ellos, ya que en este caso específico el hongo se reproduce asexualmente. Considerando lo anterior, como se puede observar en la secuencia de imágenes presentadas en la Figura 21, la aparición del color negro, característico de la presencia de conidias en la cepa, se retarda al aplicarle las diferentes concentraciones de ZnO-NPs sintetizadas. Se puede observar que, mientras para el control la esporulación (denominación dada a la aparición de las conidias) se presentó desde el día 2; las cepas tratadas con ZnO-NPs (aciculares y esféricas) la misma se evidencio a partir de los días 4 y 6 del desarrollo del ensayo, para las concentraciones 6 y 9 mmol/L respectivamente. Por último, se observó que, en las cepas que habían sido tratadas con la concentración 12 mmol/L, no se presentó esporulación (Figura 21), resultado que pone en evidencia el efecto antifúngico de las ZnO-NPs sintetizadas y que se reitera, más adelante, con el estudio de microscopía óptica de alta resolución (MOAR).

Figura 21. Secuencia de imágenes del crecimiento de *Aspergillus niger* con los diferentes tratamientos realizados empleando las ZnO-NPs sintetizadas. De izquierda a derecha 2, 4, 6 y 8 días de ensayo



En las figuras 22 y 23 se puede apreciar el crecimiento de *Botrytis cinerea in Vitro*, sin tratamiento (Control) y tratado con las ZnO-NPs sintetizadas (morfología acicular y esférica). En las figuras 22a y 23a se aprecia la gran diferencia que presenta el crecimiento de la muestra control frente a las cepas tratadas con ZnO-NPs. La fase de latencia o adaptación para el testigo (Control) duro un día mientras que los hongos afectados, con el óxido de cinc, no salieron de esta fase de crecimiento hasta el octavo día. Por otro lado, la fase lineal de crecimiento en el hongo sin tratamiento (control) se dio entre los días 2 y 6 mientras que en las cepas de *Brotrytis* tratadas con Nanopartículas (esferoidales y aciculares) no se observó este comportamiento, incluso al utilizar la concentración más baja (6 mmol/L), lo que evidencio la significativa afectación que propicia la presencia de las ZnO-NPs en los cultivos del hongo. Debido a que, en este caso, el efecto de las ZnO-NPs es muy notorio, lográndose una gran inhibición del crecimiento del hongo, se optó por comparar, por separado, los tratamientos con nanopartículas aciculares (Figura 22b) y con esféricas (Figura 23b) sin graficar, en las mismas, la curva de crecimiento del control para que sea más evidente el comportamiento de los tratamientos con diferentes concentraciones de nanopartículas en el medio de cultivo. En estas curvas, figuras 22b y 23b, se observa que el grado de crecimiento del *Botrytis cinerea* se redujo ligeramente al incrementar la concentración de ZnO-NPs en el medio de cultivo.

Figura 22. Curvas de crecimiento de *Botrytis cinerea* sin y con presencia de ZnO-NPs con morfología acicular, (a). Comparando con el crecimiento normal del hongo y (b). Sin la curva de crecimiento normal del hongo.

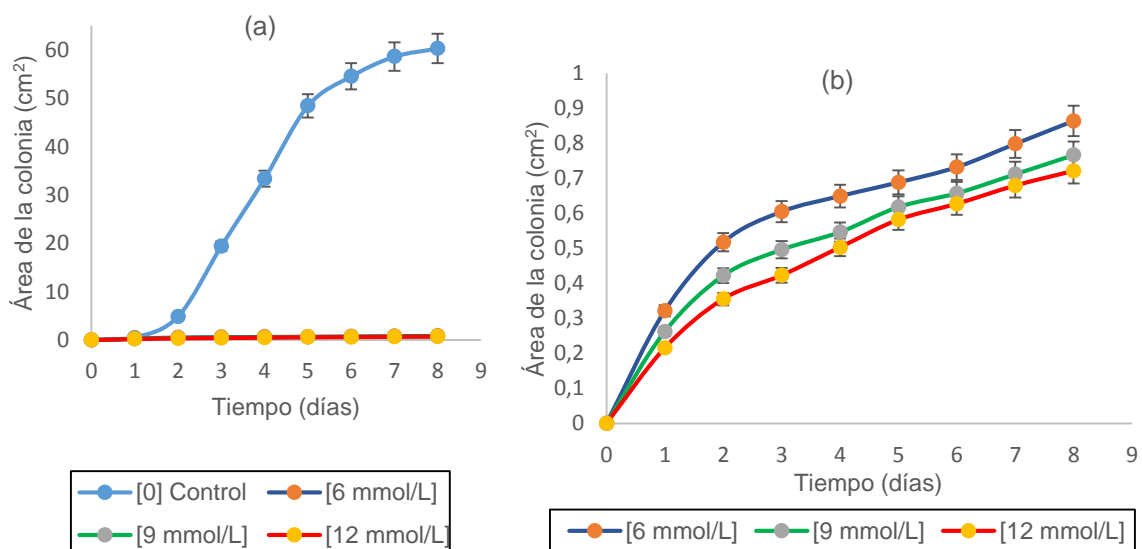
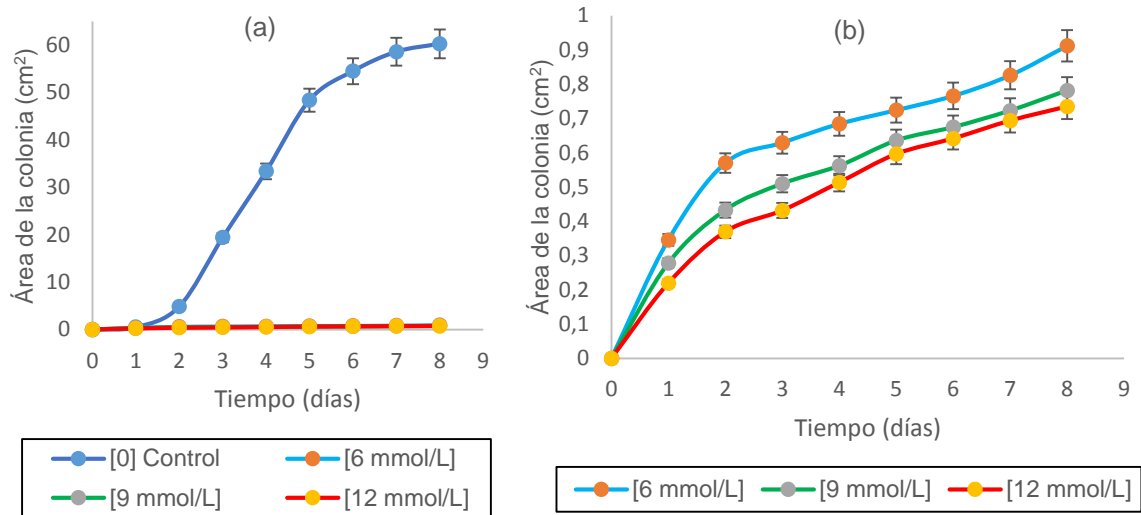


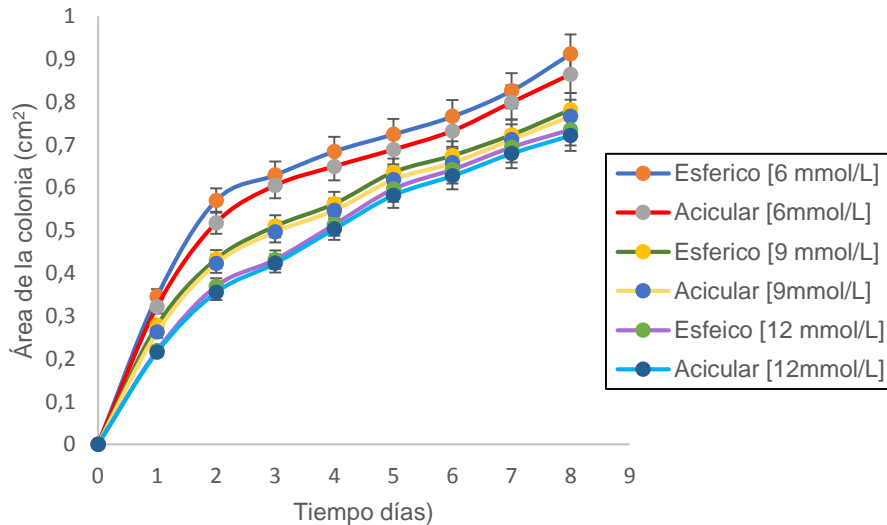
Figura 23. Curvas de crecimiento de *Brotrytis cinerea* sin y con presencia de ZnO-NPs con morfología acicular, (a). Comparando con el crecimiento normal del hongo y (b). Sin la curva de crecimiento normal del hongo.



Nota: Las barras verticales son la desviación estándar.

En la figura 24 se compara el efecto que tienen las ZnO-NPs, en sus dos morfologías y tres concentraciones (6, 9 y 12 mmol/L), sobre el crecimiento del hongo *Brotrytis cinerea*. Como se observó en las figuras 22 y 23, para todos los tratamientos realizados, las nanopartículas inhibieron en alto grado el crecimiento del hongo; el tratamiento más eficiente fue aquel donde se empleó la concentración 12 mmol/L, independiente de la morfología de las nanopartículas (figura 24). También es evidente, observando las curvas de la figura 24, que para todos los tratamientos con ZnO-NPs los primeros dos días fueron los de mayor crecimiento del hongo, a lo que le siguió una etapa de desaceleración a partir del día 2, patrón de comportamiento de crecimiento diferente al que presentó el *A. niger* al someterlo a un tratamiento similar (Figura 20); en este último, su fase de mayor crecimiento se presentó para las concentraciones de 9 y 12 mmol/L entre los días 2 al 6, independiente de la morfología de las nanopartículas.

Figura 24. Comparación de las curvas de crecimiento del *Botrytis cinerea* al someterlo a tratamientos con ZnO-NPs, acicular y esférico, a diferentes concentraciones.



Nota: Las barras verticales son la desviación estándar.

En el cuadro 11 se indican los valores de los parámetros derivados de las curvas de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* (Figuras 22 a 24), para cada uno de los tratamientos evaluados. La tasa o velocidad de crecimiento en la fase lineal, de las cepas tratadas con las ZnO-NPs, no se pudo determinar debido a que la fase lineal de crecimiento del hongo no se presentó en ninguna de las concentraciones evaluadas (6, 9 y 12 mmol/L), para las dos morfologías de las ZnO-NPs sintetizadas. Sin embargo, para obtener una información aproximada sobre esta cantidad que permitiera comparar los tratamientos entre sí, se obtuvo la velocidad de crecimiento del hongo entre los días 0 y 2, período de tiempo en el que el *B. cinerea*, sometido a la acción de las ZnO-NPs, presenta mayor crecimiento. De los datos del cuadro 11 se puede observar que los resultados obtenidos de esta cantidad, para los hongos tratados con nanopartículas, estos fueron muy similares para las dos morfologías reduciéndose al aumentar la concentración de Nanopartículas en el cultivo; calculando la tasa de crecimiento del control (12,835 cm²/día), considerando los días 2 y 6 del ensayo, evidentemente la tasa de crecimiento de los hongos tratados fue muy inferior (Cuadro 11). Al comparar el área alcanzada por el hongo control al octavo día, 60,288 cm², con la de los hongos tratados, se evidencia una fuerte acción inhibitoria de las ZnO-NPs sobre el crecimiento de la cepa, siendo mayor para la concentración 12 mmol/L y levemente superior para las ZnO-NPs con morfología acicular. El cuadro 11 muestra, también, los porcentajes de inhibición del

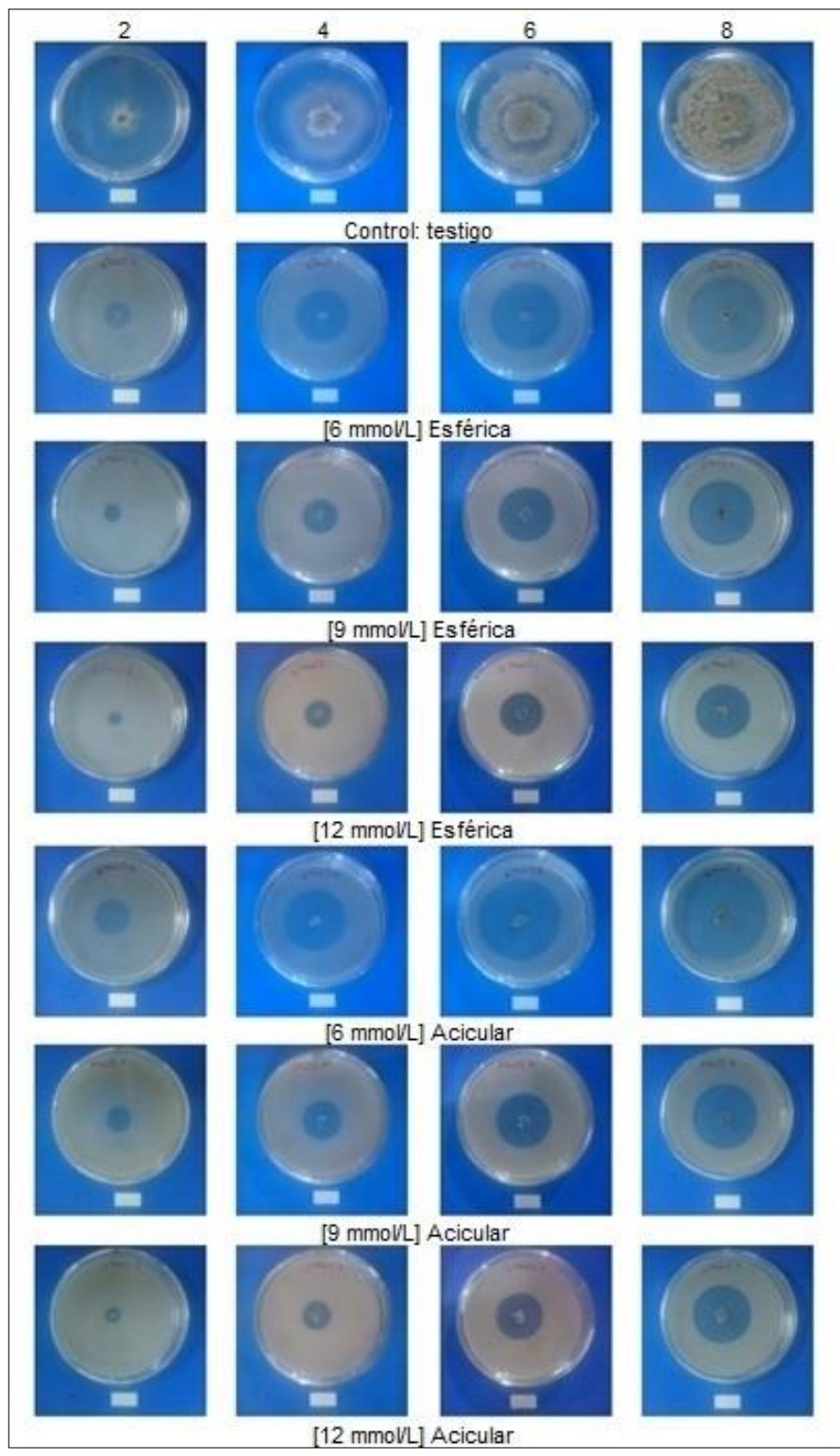
crecimiento del hongo, para cada uno de los tratamientos, valores muy similares con un leve incremento al aumentar la concentración de ZnO-NPs en el PDA.

Cuadro 11. Valores de parámetros derivados de las curvas de crecimiento del *Botrytis cinerea*, para los tratamientos antifúngicos realizados con las ZnO-NPs sintetizadas, considerando diferentes concentraciones y morfologías.

Cepa: <i>Botrytis cinerea</i>				
TRATAMIENTO: concentración y morfología usada.	CRECIMIENTO DE LA COLONIA DÍA 8 (cm ²)	TASA DE CRECIMIENTO (cm ² /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (DÍAS)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
Testigo (Control)	60,288	12,8350	4	-
Esférica (6 mmol/L)	0,912	0,2850	0	98,57
Acicular (6 mmol/L)	0,864	0,2588	0	98,49
Esférica (9 mmol/L)	0,781	0,2163	0	98,73
Acicular (9 mmol/L)	0,766	0,2112	0	98,70
Esférica (12 mmol/L)	0,735	0,1847	0	98,80
Acicular (12 mmol/L)	0,721	0,1777	0	98,78

En la figura 25 se ilustra de manera más gráfica el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* sin tratamiento (control) y tratado con nanopartículas de ZnO (diferentes morfologías y concentraciones), donde se aprecia la inhibición, casi completa, del crecimiento del hongo para todos los tratamientos realizados. Con respecto al halo de inhibición, se presentó una tendencia de comportamiento similar a la del *A. niger* (Figura 21), encontrándose que al aumentar la concentración de ZnO-NPs, en el medio, el halo disminuyó de tamaño y aumentó con el paso de los días. El color grisáceo que presentaron algunas cajas de los cultivos fue ocasionado por la aparición de conidióforos o hifas reproductivas que contenían las células conidiógenas, portadoras de conidios hialinos y unicelulares de color gris, responsables de la reproducción asexual del hongo. Este color grisáceo fue más evidente en el tratamiento control, no así en los hongos tratados con ZnO-NPs, desapareciendo prácticamente en los cultivos con concentraciones altas, 9 y 12 mmol/L, sin diferencias significativas entre los tratamientos con partículas aciculares y esferoidales. Para este caso también es probable que la acción inhibitoria del crecimiento del hongo se deba a la perturbación de la reproducción de éste por la presencia de las ZnO-NPs en los cultivos, propuestas que se estudiará en futuros trabajos.

Figura 25. Secuencia de imágenes del crecimiento del *Botrytis cinerea* con los diferentes tratamientos realizados empleando las ZnO-NPs sintetizadas. De izquierda a derecha 2, 4, 6 y 8 días de ensayo.



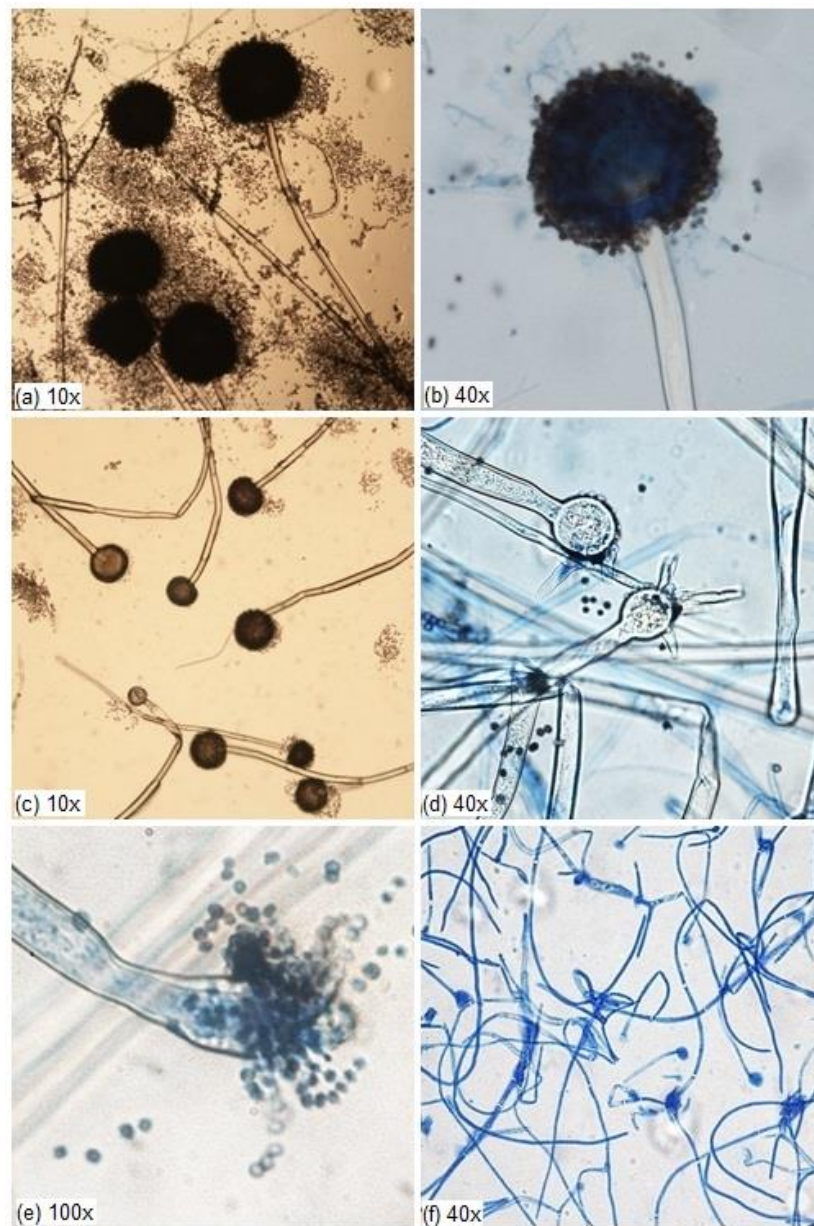
Lo resultados obtenidos para el *Aspergillus niger* (Figuras 19 a 21 y cuadro 10) y *Brotrytis cinerea* (Figuras 22 a 25 y cuadro 11), ponen en evidencia el poder antifúngico de las Nanopartículas de óxido de cinc, reiterando lo que indican trabajos previos realizados por otros investigadores sobre este tema (He *et al.*, 2011; Rajiv *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2015). Los resultados e información, contenidos en este Trabajo de Grado, se pueden tomar como referentes para realizar trabajos a futuro en esta temática o para abordar temas relacionados como, por ejemplo, el desarrollo de empaques antifúngicos, teniendo en cuenta que las concentraciones utilizadas para hacer evidente esta funcionalidad son bajas, del orden de 6 a 12 mmol/L, que no modificaría apreciablemente las dosificaciones de las otras materias primas utilizadas en el conformado de estos empaques

4.2.2. Estudio con microscopia de alta resolución (MOAR) de la estructura de los hongos *Aspergillus niger* y *brotrytis cinerea* sometidos a la acción de las nanopartículas de ZnO. Para obtener información de la acción de las ZnO-NPs sobre los hongos de interés, útil para estructurar el mecanismo a través del cual las nanopartículas afectan el crecimiento de *Brotrytis cinerea* y *Aspergillus niger*, se empleó el MOAR para examinar los cambios estructurales de muestras de hongos después del tratamiento con ZnO-NPs. A algunas de las improntas tomadas se les aplicó colorante (azul de lactofenol) para resaltar las estructuras del hongo. Como se observa en la figura 26, los mayores cambios se presentaron cuando se aumentó la concentración de nanopartículas en el medio, pero que ellas presentaran una morfología u otra no fue relevante.

Específicamente, al realizar los estudios con MOAR de las colonias de *A. niger*, en el tratamiento control se observaron conidióforos de aspecto normal y con abundante presencia de conidios; además, la forma redondeada (globosa) de las cabezas conidiales, característica de este hongo, se observa en las fotografías respectivas (Figuras 26a y 26b). Por otro lado, el hongo sometido a la acción de las ZnO-NPs, en una concentración 6 mmol/L, redujo de manera considerable la esporulación (producción de conidios) por el retardo en la formación de los conidióforos (Figura 26c). Con este tratamiento, las estructuras morfológicas del hongo (hifas, conidióforos y conidios) no presentaron cambios considerables por la presencia del óxido. En el hongo tratado con la concentración de 9 mmol/L de ZnO-NPs fue evidente la supresión del desarrollo conidial, lo que distorsionó y deterioró los conidióforos del *A. niger* (Figuras 26d y 26e), evitando su normal esporulación y por lo tanto el crecimiento del hongo se inhibió fuertemente. Finalmente, en el tratamiento con 12 mmol/L de ZnO-NPs, durante 8 días, la germinación de la cepa de *A. niger* fue completamente inhibida tal que no se evidenció formación de cabezas conidiales y por lo tanto la esporulación se eliminó completamente (Figura 26f). Este resultado, del comportamiento de los hongos sometidos a la acción de las ZnO-NPs, es de gran relevancia porque la reproducción del *Aspergillus niger* implica principalmente formación de esporas, lo que indicaría que el mecanismo de acción

de las ZnO-NPs sobre este hongo estaría relacionado con el impedimento de su reproducción asexual, por la no formación de estructuras reproductivas (conidióforos y conidios), como lo muestra la figura 26f.

Figura 26. Imágenes obtenidas con MOAR de los conidióforos, conidios e hifas del *Aspergillus niger* tratado con: (a) y (b) 0 mmol/L de ZnO (control), (c) 6 mmol/L de ZnO, (d) 9 mmol/L de ZnO, (e) 9 mmol/L ZnO y (f) 12 mmol/L de ZnO.

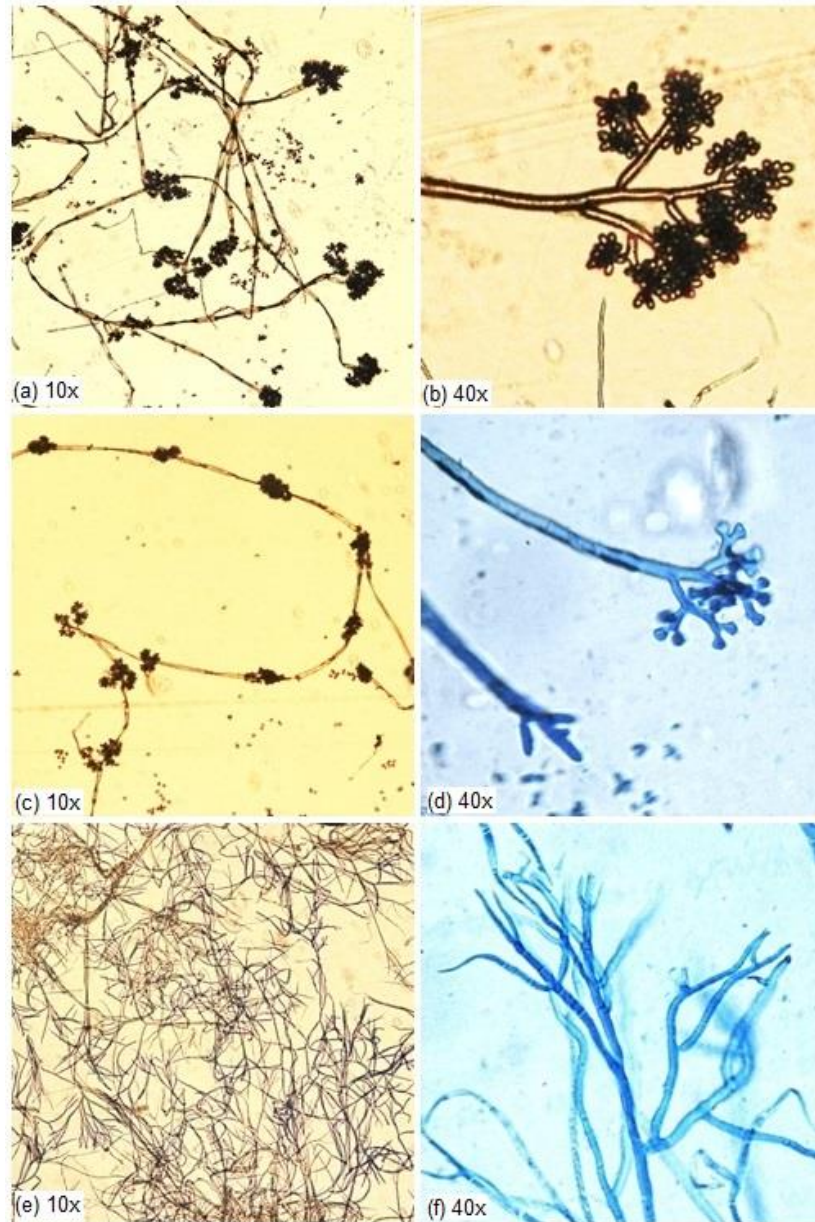


Un trabajo previo importante, relacionado con esta temática (Rajiv *et al.*, 2013), mostró que la actividad antifúngica de nanopartículas de óxido de cinc, obtenidas por síntesis verde, sobre *Aspergillus flavus* (MTCC-7589), *Aspergillus niger* (MTCC-2587), *Aspergillus fumigatus* (MTCC-2550), *Fusarium culmorum* (MTCC-2090) y *Fusarium oxysporium* (MTCC-3379), dependía del tamaño de partícula, siendo las más eficientes las de 27 ± 5 nm; desafortunadamente no abordaron el análisis del mecanismo de acción de las ZnO-NPs sobre cada una de las cepas.

Por otro lado, los análisis realizados con MOAR a las cepas de *botrytis cinerea* mostraron que el hongo sin tratamiento (control) presentaba conidióforos ramificados, en forma de árbol característicos de esta especie, e hifas sin defectos, verificando un desarrollo normal del hongo (Figura 27a y 27b); conidios de forma ovalada se observaron, en gran cantidad, en todas las colonias del testigo. Sin embargo, el hongo sometido a la acción de las ZnO-NPs, en su concentración más baja (6 mmol/L - Figura 27c), presentó cambios evidentes en su estructura, entre ellos disminución en la cantidad de sus conidióforos y por lo tanto reducción en la conidiogénesis (producción de esporas o conidios), lo que debió afectar la reproducción normal del hongo, acción que se observa en la figura 27c. Al tratar el hongo, con una concentración 9 mmol/L de ZnO-NPs, se produjo un evidente efecto sobre la producción de conidios, reduciendo su cantidad de manera apreciable debido, muy probablemente, a que se interrumpió la formación de conidióforos en las colonias (figura 27d). El efecto de las ZnO-NPs sobre las hifas se apreció muy bien al someter al hongo a un tratamiento con una concentración de 12 mmol/L, de estas nanopartículas, ya que el patógeno presentó hifas muy ramificadas y tortuosas, y no se observaron conidióforos ni conidios (Figura 27e y 27f); este resultado indica que las ZnO-NPs ocasionaron deformación en la estructura de las hifas del *B. cinerea* además de distorsión y deterioro de sus conidióforos. Aunque se presentan diferencias morfológicas apreciables entre las cepas sometidas a los diferentes tratamientos con ZnO-NPs (Figura 27), esto no se reflejó en el tamaño de las colonias (Figura 24), donde todas mostraron un área de crecimiento similar.

En un trabajo relacionado con este temática, He y colaboradores (He *et al.*, 2011) también estudiaron el efecto de las nanopartículas de ZnO sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y concluyeron que, con concentraciones de 12 mmol/L, el efecto inhibitorio producido por las ZnO-NPs se debía, principalmente, a que las nanopartículas afectaban el desarrollo normal de las hifas, ocasionando que estas perdieran su suavidad y estructura típica de "red", observándose protuberancias inusuales en su superficie. Por lo enunciado anteriormente, el resultado de este trabajo de grado está muy relacionado con el obtenido por He y colaboradores (He *et al.*, 2011).

Figura 27. Imágenes obtenidas con MOAR de conidióforos, conidios e hifas de *Botrytis cinerea* tratado con ZnO-NPs, a concentraciones de: (a) y (b) 0 mmol/L (control), (c) 6 mmol/L, (d) 9 mmol/L, (e) 12 mmol/L y (f) 12 mmol/L.



Los resultados de actividad antifúngica manifiestan las diferencias existentes en el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea*, cuando son sometidos al efecto de las ZnO-NPs. Con concentraciones de 6 y 9 mmol/L el *B. cinerea*, es más

sensible a la actividad de las nano partículas que el *A. niger*, mientras que con la contracción de 12 mmol/L se evidencia un comportamiento similar en el crecimiento.

Los resultados de los ensayos de actividad antifúngica de las ZnO-NPs sintetizadas en este trabajo, sobre *Aspergillus niger* (figura 25) y *Botrytis cinerea* (figura 27), mostraron diferente afectación sobre el crecimiento de cada hongo. Específicamente, para las concentraciones 6 y 9 mmol/L, de ZnO-NPs, el *B. cinerea* fue más afectado que el *A. niger* mientras que para la contracción 12 mmol/L el efecto de crecimiento y desarrollo para los dos hongos fue muy similar. Una posible explicación a esta diferencia de comportamiento puede estar relacionada con la tolerancia innata de cada hongo a las nanopartículas (He *et al.*, 2011). He y colaboradores (2011), usando SEM y espectroscopia Raman, mostraron que pueden actuar distintos mecanismos de acción de las ZnO-NPs sobre diferentes tipos de hongos. Ellos encontraron que las ZnO-NPs inhibían el crecimiento del *B. cinerea* por interferencia de su función celular, ocasionando deformación en sus hifas, mientras que para el caso del *P. expansum*, con concentraciones superiores a 6 mmol/L, la inhibición completa era propiciada por el impedimento del desarrollo de sus conidióforos y conidios

Por otro lado, Sharma y Ghosen (Sharma *et al.*, 2015) estudiaron la actividad antifúngica de ZnO-NPs frente al hongo *Candida albicans*, usando para ello el método de susceptibilidad a la difusión en disco. Ellos observaron que, al aumentar la concentración de ZnO-NPs en los discos de papel absorbente, la zona de inhibición también aumentaba, lo que indicaba la reducción del tamaño de la colonia en la caja de petri. Ellos propusieron que la actividad antifúngica del ZnO era propiciada por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por su sigla en inglés).

4.3. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA A PARTIR DE ALMIDÓN Y ZnO-NPs.

4.3.1. Obtención de películas de almidón con ZnO-NP: método de casting.

Para estructurar la metodología que permitiera incorporar las ZnO-NPs en una matriz polimérica de origen natural, se prepararon varias películas con base en almidón de yuca (variedad Verónica de Paraguay) y nanopartículas de ZnO, mediante el método de solución-casting. Obtenidas las películas, se encontró que el contenido de NPs adicionado a la mezcla de materia prima original no afectaba la conformación de las mismas, incluso cuando se utilizó la concentración más elevada. De acuerdo a estudios y resultados previamente enunciados (numeral 4.2.) se encontró que para los hongos fitopatógenos de interés las concentraciones de ZnO-NPs que presentaron mejores resultados, en la inhibición del crecimiento de las cepas, fueron las de 9 y 12 mmol/L, independiente de la morfología de la

partícula. Estos resultados se utilizaron como referentes para establecer la cantidad de nanorelleno que se podría adicionar a la formulación de las películas; por esto se eligieron dos concentraciones de ZnO-NPs, 2 y 2,5% w/w, que se calcularon con base al contenido de almidón. Al relacionar estas concentraciones, con el contenido de agua agregado a la formulación (150 mL), estas quedaron expresadas como 9,83 y 12,28 mmol/L, garantizando que hay una adecuada correlación con las concentraciones que propiciaron la inhibición de los patógenos en el medio de cultivo. El pequeño incremento en la concentración de ZnO-NPs se realizó para facilitar la formulación de las películas y porque se ha comprobado que cuando se incorpora un agente antifúngico, a un polímero o empaque, este puede reducir su actividad (Ibarra *et al.*, 2016). Además, la bibliografía consultada sobre este tema (Nafchi *et al.*, 2012; Nafchi *et al.*, 2013 y Castaño., *et al* 2013) respalda el uso de estas dos concentraciones.

Durante el proceso de elaboración de las películas se registró que el inicio de la gelatinización se presentaba a $\sim 65^{\circ}\text{C}$, temperatura a la que normalmente ocurre lo que indicaba que la presencia de las ZnO-NPs no afectó la formulación. Debido a que las películas elaboradas por casting no se caracterizaron detalladamente, ya que el interés era determinar su capacidad antifúngica, no se indican más detalles sobre sus propiedades. Desde el punto de vista cualitativo, se observó que, con la presencia de las ZnO-NPs, las películas de almidón perdían su transparencia, condición que fue más notable en aquellas que se elaboraron con la concentración 2,5% w/w (Figura 28). No se percibieron defectos (burbujas y/o aglomerados de NPs) en la superficie de las películas obtenidas, con o sin (control) nanopartículas de ZnO, evidenciándose el efecto favorable del empleo de ultrasonido durante el conformado de las películas. El uso de moldes de teflón resulto apropiado debido, principalmente, a que facilitó la extracción de las películas.

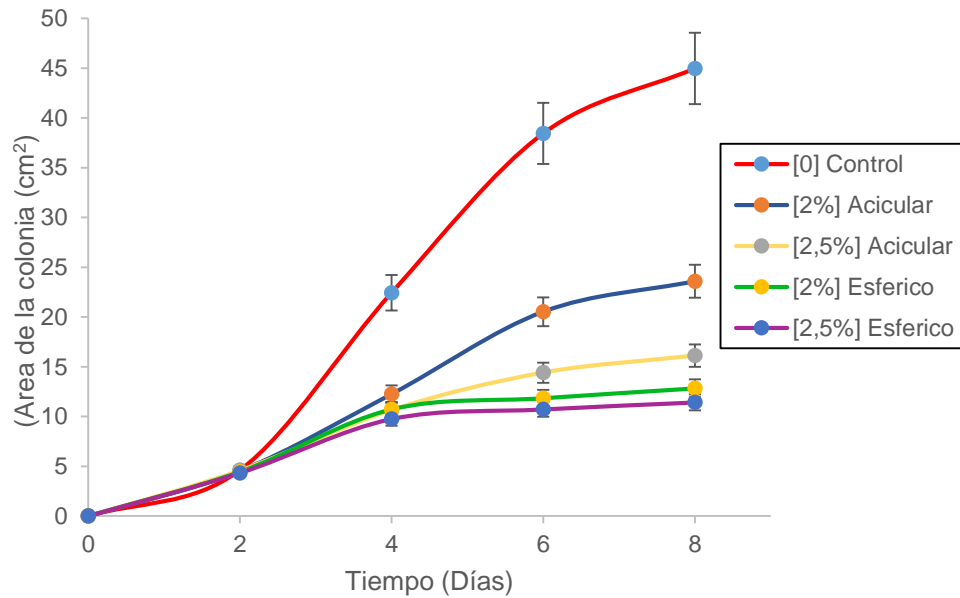
Figura 28. Películas de almidón elaboradas por casting (a). Sin ZnO-NPs y (b). Con ZnO-NPs (2,5%).



4.3.2. Determinación de la actividad antifúngica, *in vitro*, de las películas con almidón y ZnO-NPs obtenidas por casting: método de discos. El principal objetivo de la elaboración de las películas de almidón con ZnO-NPs, por el método de casting, fue el de determinar su actividad antifúngica sobre las cepas seleccionadas para este estudio. Comprobada esta funcionalidad de las películas con NPs, el interés era definir la concentración adecuada de nanorelleno para inhibir los hongos, información importante para elaborar posteriormente las películas por el método de extrusión-soplado.

4.3.2.1. Efecto de las películas conformadas con almidón y ZnO-NPs, obtenidas por casting, sobre el crecimiento del *A. niger* y del *B. cinerea*. Las curvas de crecimiento de las figuras 29 y 31 muestran el efecto de las películas, que contenían ZnO-NPs en las dos morfologías, sobre el crecimiento de las cepas de interés. El crecimiento del *A. niger* fue impedido por la presencia de las películas con nanopartículas de ZnO (figura 29), efecto que fue más notable cuando se analizaron las películas que contenían NPs con morfología esférica, siendo más eficientes que las películas con ZnO-NPs acicular para todas las concentraciones estudiadas. La película que propició una mayor inhibición en el crecimiento de la cepa fue aquella que tenía la concentración más alta de nanorelleno (2,5% w/w) en la película, comportamiento que se presentó independiente de la morfología de partícula empleada. Estos resultados reiteran la eficiencia de las ZnO-NPs como agente antifúngico, incluso al incorporarlas a polímeros termoplásticos. Debido a que el medio de cultivo (PDA) no tenía ninguna condición especial que pudiera perturbar el normal crecimiento del hongo, el efecto de las ZnO-NPs se hizo más evidente después del cuarto día (Figura 29 y 30), cuando el hongo entró en contacto con los recortes de las películas conformadas. La fase de latencia, para todos los tratamientos, duró dos días (Figura 29) y la fase lineal de crecimiento del hongo testigo (control) se presentó entre los días 2 y 6, comportamiento similar al observado en la curva de crecimiento del *A. niger*, sin tratamiento con ZnO-NPs (Control), en los ensayos de actividad antifúngica del numeral 4.2.1 (Figura 20 y 21).

Figura 29. Curvas de crecimiento de *Aspergillus niger* en presencia de películas elaboradas con almidón y ZnO-NPs (diferentes morfologías y concentraciones).



Nota: Las barras verticales son la desviación estándar.

En el cuadro 12 se indican los valores de las variables derivadas de la curva de crecimiento del *A. niger* (Figura 29). La tasa de crecimiento normal del hongo se vio afectada por la presencia de las películas con ZnO-NPs en los cultivos, reducción que fue más evidente cuando se ensayaron películas formuladas con 2,5% w/w de nanopartículas de ZnO, tal que la duración de la fase lineal de crecimiento fue de 2 y 3 días para partículas con morfología esferoidal y acicular, respectivamente. La inhibición del crecimiento (%) fue mayor en los empaques que contenían las ZnO-NPs de morfología esferoidal, alcanzándose porcentajes similares a los obtenidos con la concentración de 9 mmol/L en los ensayos de actividad antifúngica de las ZnO-NPs (Numeral 4.2.1. cuadro 11).

Cuadro 12. Valores de los parámetros obtenidos de la curva de crecimiento de la cepa *Aspergillus niger*, para los diferentes tratamientos con películas que contenían las ZnO-NPs sintetizadas.

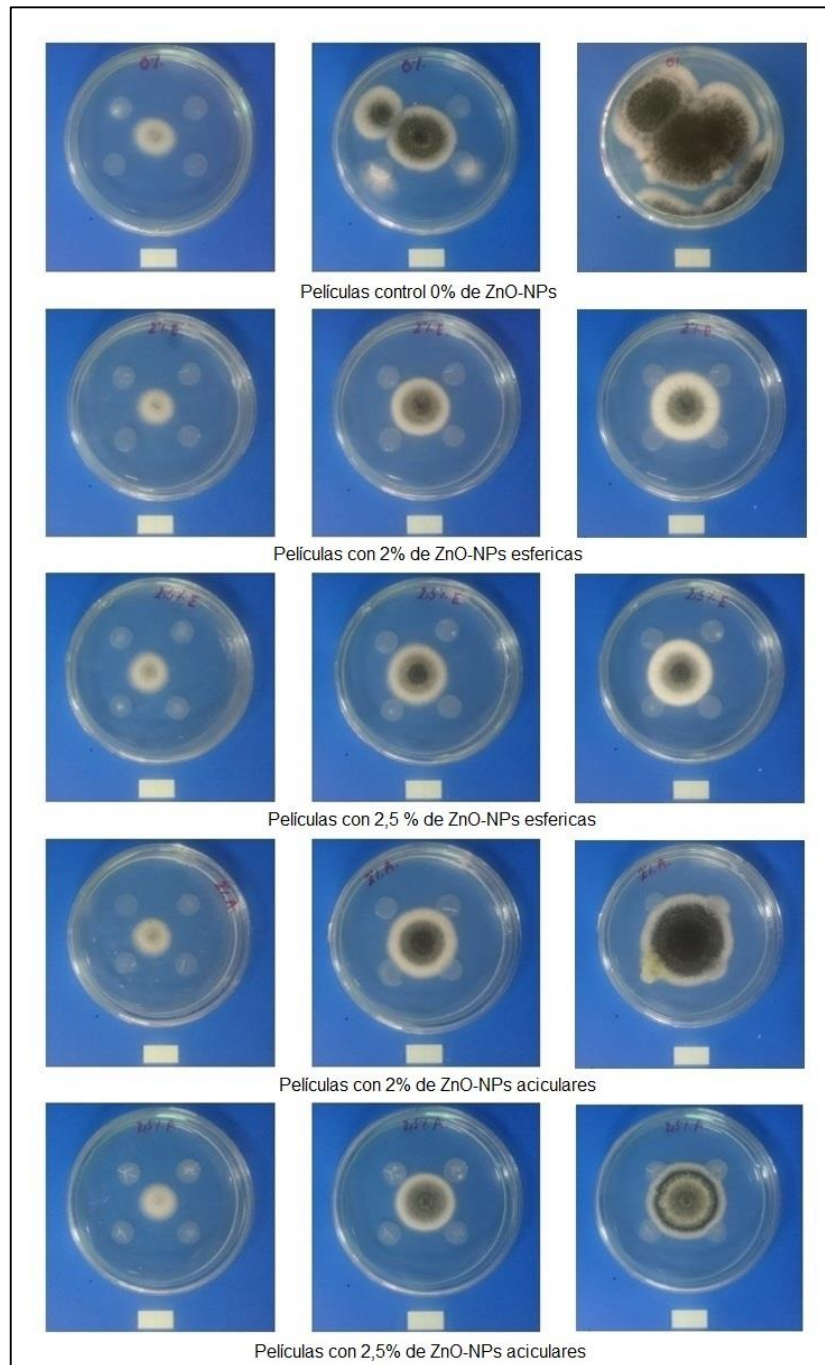
Cepa: <i>Aspergillus niger</i> .				
TRATAMIENTO: concentración y morfología incorporada en la película.	CRECIMIENTO DE LA COLONIA DÍA 8 (cm ²)	TASA DE CRECIMIENTO (cm ² /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
Película (Control)	44,979	8, 4553	4	-
Esférica (2%)	12,828	3,1385	2	71,48
Acicular (2%)	23,594	3,9984	3	47,54
Esférica (2,5%)	11,419	2,7125	2	74,61
Acicular (2,5%)	16,122	2,4580	3	64,16

En la figura 30, se puede apreciar de manera más gráfica el crecimiento de *Aspergillus niger* afectado por la presencia de las películas con ZnO-NPs. Como se esperaba, los resultados no revelaron halo de inhibición cuando se usaron películas de almidón (con o sin ZnO-NPs) en lugar de discos de papel absorbente para esta metodología (Numeral 3.2.4.), lo que confirma que el almidón no presenta ningún efecto antimicrobiano o antifúngico. En los cultivos donde se utilizaron películas que contenían NPs con morfología acicular se observó disminución del crecimiento del hongo, siendo más apreciable para la concentración 2,5% w/w. Sin embargo, el hongo afecto finalmente las películas, observándose un crecimiento de él sobre la superficie de las mismas; no se evidenció crecimiento del hongo en el área de contacto con la película en aquellas que contenían ZnO-NPs con morfología esférica (figura 30); por lo tanto, la presencia del ZnO esférico produjo un efecto microbiostático contra el *Aspergillus niger*. Además, la ausencia de un halo de inhibición, incluso para la mayor concentración de ZnO-NPs, sugiere un buen agarre de los compuestos activos en la matriz de la película nanocompuesta (es decir, la liberación de los compuestos de la matriz conduciría a la presencia de un halo de inhibición).

Además del crecimiento, el aspecto físico de la colonia de los hongos también fue afectado por las películas nanocompuestas. En la figura 30 se observa que las cepas tratadas con las películas que contenían ZnO-NPs presentaron escasa esporulación y un crecimiento micelial anormal: el hongo creció verticalmente evitando el contacto con los discos, encapsulando los conidióforos con el micelio (color blanco presente en las colonias). El color negro que presentan las colonias (Figura 30), característico de los conidios y conidióforos del *A. niger*, fue menos

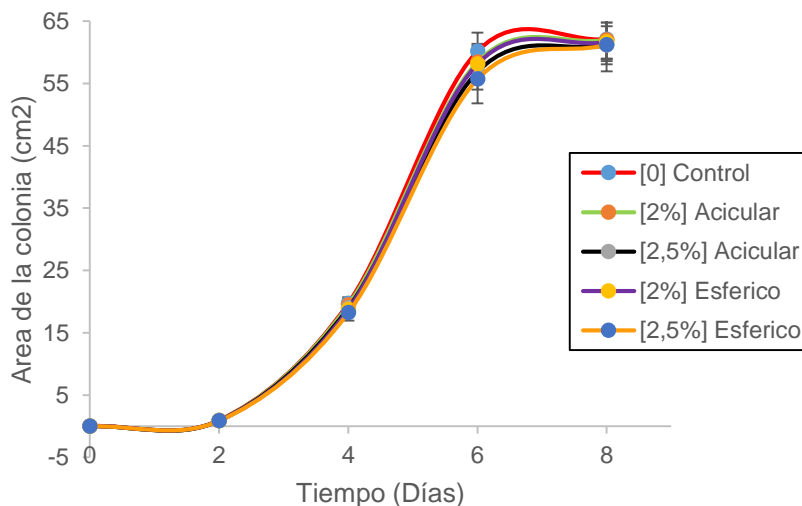
evidente en las cepas que contenían películas con ZnO-NPs morfología esferoidal, indicando afectación de la reproducción normal del hongo.

Figura 30. Secuencia de imágenes que muestran el crecimiento del *Aspergillus niger* sometido a diferentes tratamientos con películas que contenían ZnO-NPs (diferentes concentraciones y morfología, de izquierda a derecha días 2, 4, 8 del ensayo).



Para el caso del *Botrytis cinerea*, no se evidenció efecto alguno de la presencia de las películas con ZnO-NPs sobre su crecimiento (Figura 31); en todos los tratamientos evaluados se observó un grado y patrón de crecimiento similar (Figura 31), sin diferencias apreciables en las fases de latencia y lineal del crecimiento del hongo. Este resultado indica que al incorporar las ZnO-NPs a la matriz polimérica no evidenció efecto antifúngico, sobre el *Botrytis cinerea*, que ellas presentaron al evaluarlas independientemente (Figuras 22 a 25). En las curvas de crecimiento de la figura 31, la fase lineal se presentó entre los días 2 y 6, tanto para el hongo sin tratamiento (control) tanto para los sometidos a la acción de las películas con ZnO-NPs.

Figura 31. Curvas de crecimiento obtenidas para el *Botrytis cinerea* sometido a tratamiento con películas elaboradas a partir de almidón y que contenían ZnO-NPs.



Nota: Las barras verticales son la desviación estándar.

El cuadro 13, construido a partir de la curva de crecimiento (Figura 31), muestra que la tasa de crecimiento del *B. cinerea* no se vio afectada por la acción de las ZnO-NPs inmovilizadas en la película, solo se observó una pequeña reducción con la película que contenía la concentración más alta de nanorrelleno (2,5% w/w). En el crecimiento final del hongo, día 8, no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos realizados, observándose un bajo porcentaje de inhibición del hongo, 1,54% para el más significativo tratamiento evaluado (2,5% de ZnO-NPs esféricas). Este resultado contrasta con el obtenido para las ZnO-NPs, sin matriz polimérica (numeral 4.2.1, figuras 22 a 25 y tabla 11), donde, para esta cepa, con la concentración más baja (6 mmol/L) se obtuvo una inhibición de más

del 98 % en el crecimiento del hongo, independiente de la morfología de las nanopartículas.

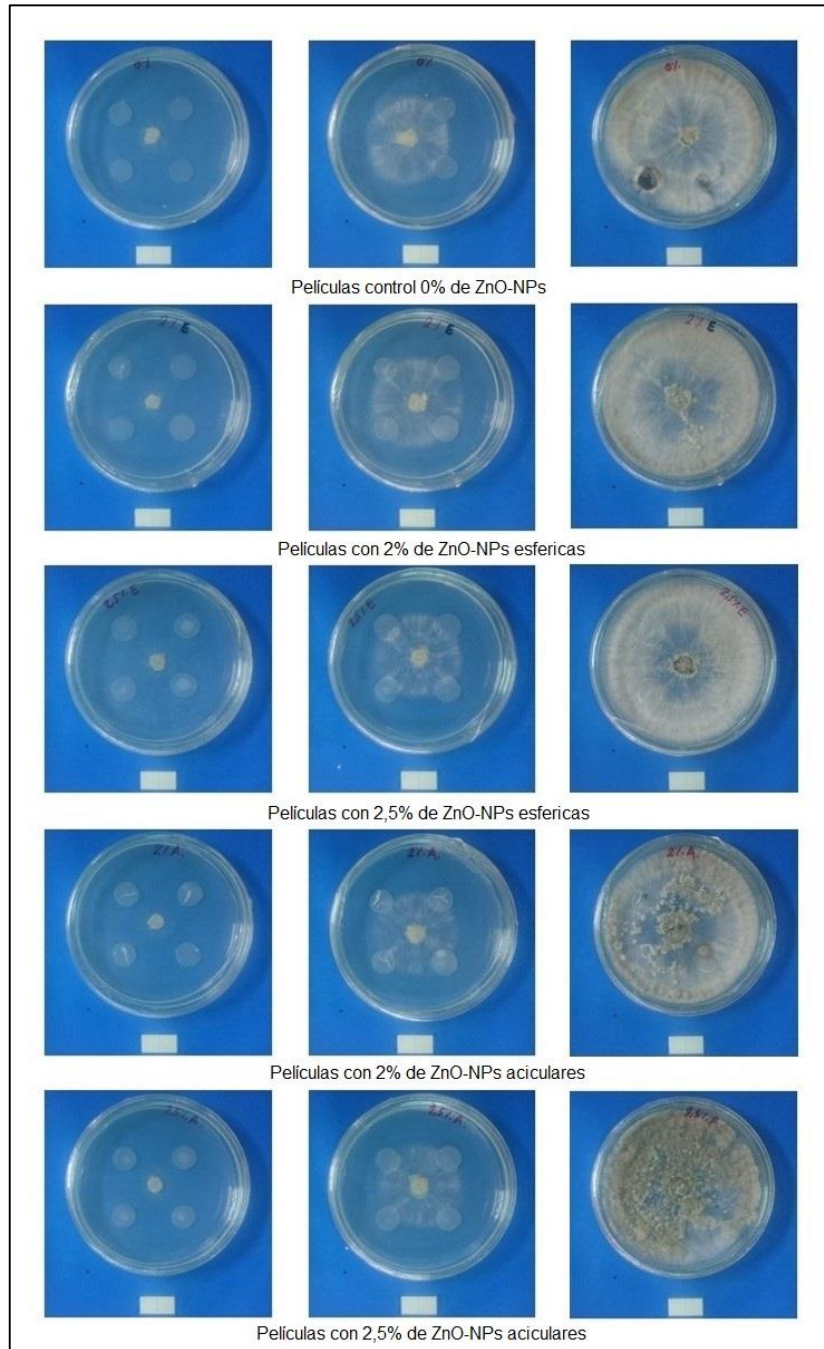
Cuadro 13. Valores de los parámetros obtenidos de la curva de crecimiento de la cepa de *Botrytis cinerea*, para los diferentes tratamientos con películas que contenían las ZnO-NPs sintetizadas.

Cepa: <i>Botrytis cinerea</i>				
TRATAMIENTO: concentración y morfología incorporada en la película.	CRECIMIENTO DE LA COLONIA DÍA 8 (cm ²)	TASA DE CRECIMIENTO (cm ² /día)	DURACIÓN FASE LINEAL (días)	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)
Película (Control)	62,09	14,810	4	-
Esférica (2%)	61,658	14,312	4	0,70
Acicular (2%)	61,994	14,378	4	0,15
Esférica (2,5%)	61,215	13,710	4	1,41
Acicular (2,5%)	61,131	13,987	4	1,54

El reducido efecto de las películas nanocompuestas con ZnO-NPs, sobre el crecimiento del *B. cinerea*, se hace más evidente en la figura 32. En ella se observa que los diferentes tratamientos, con películas que contenían ZnO-NPs (diferentes concentraciones y morfología), no afectaron el crecimiento del hongo. Dado el comportamiento que se presentó en este caso con el *B. cinerea*, al usar películas con ZnO-NPs, no era de esperar presencia de halos de inhibición. Este resultado es contrario al obtenido por Cataño y colaboradores (Castaño *et al.*, 2013) quienes estudiaron el efecto antifúngico de películas elaboradas con almidón de papa y nanopartículas de ZnO. Sus resultados mostraron que las películas con el 1.32% (w/w) de ZnO-NPs inhibían, moderadamente, el crecimiento micelial del hongo, mientras que las películas con 3.75% (w/w) inhibieron completamente el crecimiento del *B. cinerea*. La baja eficiencia de las películas de almidón con ZnO-NPs, sobre el crecimiento del *Botrytis cinerea*, encontrada en el presente estudio se puede justificar considerando la morfología de crecimiento del hongo, la cual no es lo suficientemente densa (Figura 32, día 4), lo que reduciría la posibilidad de contacto entre las películas y las hifas, disminuyendo la exposición de la cepa a las ZnO-NPs (He *et al.*, 2011). A diferencia del *B. cinerea*, el *A niger* tiende a crecer más densamente sobre la superficie del medio de cultivo (Figura 30), presentándose una mayor exposición a las nanopartículas de ZnO que existen en la película, en comparación con el *B. cinerea*, y por lo tanto una mayor afectación sobre su crecimiento. El resultado anterior indica que es muy importante considerar la

estructura de crecimiento que presenta el hongo, característica del mismo, al justificar la acción antifúngica de las Nanopartículas.

Figura 32. Secuencia de imágenes que muestran el crecimiento del *Botrytis cinerea* sometido a diferentes tratamientos con películas que contenían ZnO-NPs (diferentes concentraciones y morfología, de izquierda a derecha días 2, 4, 8 del ensayo).



El aspecto físico del hongo fue poco influenciado por las películas que contenían las ZnO-NPs, tal como se observa en la Figura 32. Las colonias de los hongos tratados tenían el mismo aspecto que las del control, presentándose un mayor crecimiento vertical del micelio en las cajas de los tratamientos con películas que contenían las Nanopartículas con morfología acicular, fenómeno que ocurrió en los últimos días del ensayo. Este comportamiento, en el crecimiento del hongo, pudo ser propiciado por la resistencia natural que él debió de presentar al notar la presencia de las ZnO-NPs. La existencia de conidios y conidióforos (color gris) se evidenció en todos los tratamientos, esporulación que se hizo evidente después del cuarto día, lo que indicó que no se presentó ninguna afectación sobre la reproducción asexual del *B. cinerea* por parte de las nanopartículas.

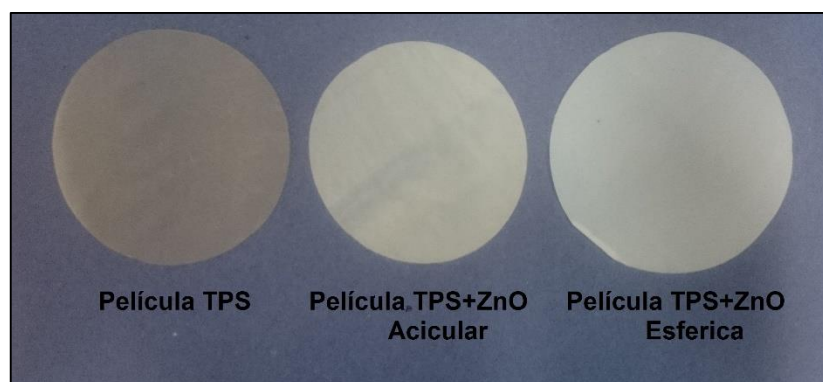
Los resultados anteriores sugieren que las NPs de ZnO se podrían utilizar como fungicida en aplicaciones agrícolas y de seguridad alimentaria. Se necesita realizar más estudios para determinar la viabilidad de incorporar las ZnO-NPs en las películas y en otros materiales de embalaje para alimentos, con el fin de controlar los problemas de inocuidad de los alimentos, de forma segura y responsable. De acuerdo con el Reglamento N° 10/2011 de la Comisión Europea, éste establece los límites generales de migración (OML), para los materiales plásticos, es de 60 mg (de sustancias) / kg (de alimento o simulador de alimentos) para todas las sustancias, como migración máxima. Este dato es importante si se considera la incorporación de ZnO-NPs a empaques que estarían en contacto directo con frutas y hortalizas. Debido a lo anterior es relevante, para investigaciones futuras, estudiar la posible migración de las ZnO-NPs hacia el alimento, cuando estas se encuentren inmovilizadas en las películas. Específicamente, los resultados de la prueba antifúngica mostraron la ausencia de un halo de inhibición en los sistemas estudiados (Numeral 4.3.2., figuras 30 y 32), indicando el desarrollo de una acción efectiva de atrapamiento de los compuestos activos. La información anterior es un buen indicio de que las películas empleadas, en este trabajo, serían seguras y se podrían usar en contacto con alimentos, resultado que coincide con el obtenido por Abreu y colaboradores (Abreu *et al.*, 2015), quienes usaron películas elaboradas con almidón y Ag-NPs.

Los resultados de la evaluación de la actividad antifúngica, de las películas que contenían ZnO-NPs, mostraron grandes diferencias con los obtenidos de la acción de las Nanopartículas sobre los hongos de interés (numeral 4.2.1), donde las que presentaron mejores resultados de inhibición del crecimiento de los mismos fueron las de morfología acicular, en las 3 concentraciones evaluadas (Figuras 19 a 25, cuadro 10 y 11). En el caso concreto de las películas con ZnO-NPs incorporadas, diferentes concentraciones y morfologías, las que tuvieron un mayor efecto sobre el crecimiento de los hongos empleados, en los ensayos, fueron las que contenían ZnO-NPs esféricas. Este comportamiento se puede justificar considerando que las ZnO-NPs esféricas presentaron un menor tamaño de partícula (Figura 18a y

18b, numeral 4.1.4.), lo que hace presagiar una mayor superficie específica, lo que facilitó su dispersión en la matriz polimérica, favoreciendo una mayor área de contacto con los hongos. Esto demuestra la importancia de obtener materiales con propiedades fisicoquímicas pre-determinadas (tamaño, superficie específica y composición química, por ejemplo), considerando sus potenciales aplicaciones o la generación de nuevas propiedades.

4.3.3. Obtención de películas a partir de almidón y ZnO-NP método de extrusión-soplado. De estudios previos, no indicados en este trabajo, se determinó que las concentraciones de 2 y 2,5%, utilizadas en los estudios de inhibición de patógenos con películas que contenían ZnO-NPs elaboradas por casting (Numeral 4.4.2.), no eran adecuadas para la obtención de películas por el proceso de extrusión-soplado. Al usar estas cantidades, se presentó un problema de dispersión de las ZnO-NPs en glicerol, impidiendo la homogeneidad de la mezcla y propiciando la aparición de aglomerados en las películas. Además, estudios recientes demuestran que con concentraciones elevadas de nanopartículas, las propiedades de las películas obtenidas por extrusión-soplado se ven desfavorecidas (Castaño *et al.*, 2013; Kanmani y Rhim, 2014 y Marra *et al.*, 2016). Por lo mencionado, se decidió elegir una concentración de ZnO-NPs que permitiría su dispersión en el glicerol y que fuera cercana a los valores que mostraron efecto antifúngico sobre las cepas de interés (Numeral 4.4.1.). La concentración de 1,5% (w/w) de las ZnO-NPs sintetizadas, con las morfologías acicular y esférica, fue adecuada para elaborar la película sin defectos, usando esta metodología. Las películas conformadas por extrusión-soplado, con adición de nanorelleno, presentaron cambio en el color y la transparencia si se comparan con las películas sin ZnO-NPs (Figura 33).

Figura 33. Películas de almidón y ZnO-NPs, diferentes morfologías elaboradas por extrusión-soplado.



4.3.4. Evaluación de las propiedades de barrera y mecánicas, por tensión, de las películas obtenidas por extrusión-soplado. Para determinar el efecto de la adición de ZnO-NPs a las películas obtenidas por extrusión-soplado, sobre sus propiedades, se realizaron las pruebas que se describen a continuación.

4.3.4.1. Permeabilidad al vapor de agua (PVA). Los resultados de esta prueba presentaron una distribución normal (ver Anexo A1). Seguido a esto, se realizó un análisis de varianza ANOVA (ver Anexo A2) encontrando que la variable de respuesta fue influenciada por el factor evaluado (morfología de partícula), posteriormente se ejecutó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene (ver Anexo A3), evidenciando que se cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianzas, dado que el valor de significancia fue mayor a $<0,05$, por lo que se dispuso a realizar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (ver Anexos A 4), de esta prueba se obtuvo que, la película que presentó menor valor de este parámetro fue la que contenía NPs aciculares, con una reducción del 58,2%. Del mismo modo, la película conformada con ZnO-NPs esféricas presentó una reducción del 47,6% que, al compararlo con el dato anterior, pone en evidencia la influencia de la morfología de las ZnO-NPs sobre la permeabilidad al vapor de agua.

Cuadro 14. Resultados experimentales obtenidos de la prueba de PVA de películas de almidón que contienen ZnO-NPs con diferentes morfologías.

Tratamiento	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) (g/m s Pa)
Película de TPS (PC)	1,4745E-10 ± 1,1885E-11
Película de TPS con ZnO-NP Acicular (PZnOA).	6,1639E-11 ± 3,7543E-12
Película de TPS con ZnO-NP Esférico (PZnOE)	7,8694E-11 ± 2,7147E-12

La disminución de la PVA, por la adición de ZnO-NPs, se puede atribuir a la resistencia al paso del agua que puede ocasionar la presencia de NPs en el Biocompuesto (almidón), de tal manera que la incorporación de los nanorellenos a la matriz, generaría una ruta tortuosa para el oxígeno y el agua, obligando al vapor de agua a moverse en una trayectoria difusiva más larga. Específicamente, las nanopartículas aciculares se podrían orientar perpendicularmente a la vía de difusión, lo que no sucede con las esféricas, lo que afectaría más la difusión del agua y el oxígeno (Nafchi *et al.*, 2012 y Nafchi *et al.*, 2013), tal como lo indican los resultados de este ensayo (cuadro 14).

4.3.4.2. Permeabilidad al oxígeno (PO). Del mismo modo, que para la prueba de PVA las películas que lograron disminuir en mayor proporción esta propiedad,

fueron las conformadas con partículas aciculares, para este caso se encontró que los valores arrojados de la prueba presentaron una distribución normal (ver Anexo A1). Seguido a esto, se realizó un análisis de varianza ANOVA (ver Anexo A2) encontrando que la variable de respuesta (permeabilidad al oxígeno) fue influenciada por el factor evaluado (morfología de partícula), posteriormente se ejecutó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene (ver Anexo A3), evidenciando que se cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianzas, dado que el valor de significancia fue mayor a $<0,05$, por lo que se dispuso a realizar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (ver Anexos A 4), de lo anterior, se obtuvo que las películas que mostraron mayor permeabilidad al oxígeno, fueron las películas de TPS. Los datos indican que, aunque los valores tienen el mismo orden de magnitud (10^{-17}) al adicionar las ZnO-NPs se presenta una reducción en ellos, siendo mayor en las películas que contienen las nanopartículas con morfología acicular (76,56%).

Cuadro 15. Resultados experimentales prueba de permeabilidad al oxígeno de películas de almidón con ZnO-NPs.

Tratamiento	Permeabilidad al oxígeno (PO) (mol/m s Pa)
Película de TPS (PC)	$6,657E-16 \pm 2,63E-17$
Película de TPS con ZnO-NP Acicular (PZnOA).	$1,56035E-16 \pm 2,7002E-17$
Película de TPS con ZnO-NP Esférico (PZnOE)	$4,11459E-16 \pm 2,89108E-17$

4.3.4.3. Propiedades mecánicas de tensión. Los resultados experimentales obtenidos al realizar este ensayo a películas conformadas con extrusión-soplado, a las que se les adicionó ZnO-NPS, se indican en el cuadro 16. Una vez introducidos estos datos al software SPSS, versión 22, se realizaron los diferentes análisis estadísticos que permite este programa, con un nivel de significancia de 0,05, para todas las pruebas que se describen a continuación.

En primer lugar, se sometieron a una prueba de normalidad Shapiro-Wilk (ver Anexos B1 y B2) comprobando que las muestras, tanto sentido longitudinal como sentido transversal, fueron extraídas de poblaciones con distribución normal. Después de ejecutados estos ensayos, con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza ANOVA en ambos sentidos (ver Anexo B3) encontrándose que la totalidad de las variables de respuesta estaban influenciadas por el factor evaluado (morfología de partícula), dado que los valores de significancia arrojados fueron menores a $< 0,05$. Con base en este resultado, se ejecutó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene (ver Anexo B4), encontrándose que, tanto

en sentido longitudinal como transversal para las tres variables de respuesta, se cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianzas, dado que el valor de significancia fue mayor a $>0,05$; cumplida esta condición, se llevó a cabo la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (ver Anexos B5), encontrándose que las películas que presentaron mayores valores, en resistencia máxima a la tensión (MPa) y módulo de elasticidad (MPa), fueron las que contenían ZnO-NPs con morfología acicular, tanto en sentido longitudinal y transversal. Para la elongación final (%), el resultado cambió siendo las películas que contenían NPs con morfología esférica las que presentaron mayores valores de este parámetro, en ambos sentidos. Si se comparan los resultados obtenidos de estas cantidades, tanto para el control (Película de TPS) como para las películas con nanorelleno, es evidente que la presencia de ZnO-NPs en la matriz, incrementó, considerablemente, todos los parámetros analizados (Resistencia máxima a la tensión (MPa), Elongación final (%) y Módulo de elasticidad (MPa)), cumpliendo las ZnO-NPs una función de refuerzo mecánico en las películas.

La prueba T de Student se realizó para comparar los resultados de las propiedades mecánicas, obtenidos en sentido longitudinal y transversal, para cada uno de los tratamientos (ver Anexo B6). El estudio mostró que para las películas control de TPS no se presentaron diferencias significativas en el módulo de elasticidad en ambos sentidos, indicando isotropía de este parámetro en la película, mientras que en las otras propiedades sí se observaron diferencias. Por otro lado, las películas que contenían partículas aciculares mostraron diferencias estadísticas significativas en los resultados de las pruebas realizadas en sentido longitudinal y transversal, para todas las propiedades evaluadas, lo que indica anisotropía de las propiedades mecánicas en estas películas. Finalmente, las películas elaboradas con NPs esféricas presentaron, también, diferencias estadísticas en las propiedades de módulo de elasticidad y elongación final.

Cuadro 16. Resultados experimentales obtenidos de la prueba de tensión de películas de almidón que contenían ZnO-NPs con diferentes morfologías.

Tratamiento		Resistencia máxima a la tensión (MPa)	Elongación final (%)	Módulo de elasticidad (MPa)	Espesor (mm)
Película de TPS (PC)	Long.	0,89 ± 0,09	48,09 ± 8,45	6,34 ± 0,63	0,417 ± 0,06
	Tras.	0,69 ± 0,03	43,22 ± 3,15	3,59 ± 0,39	
Película de TPS con ZnO-NP Acicular (PZnOA).	Long.	1,75 ± 0,13	124,74 ± 10,92	10,92 ± 1,08	0,276 ± 0,04
	Tras.	1,19 ± 0,14	147,78 ± 8,09	7,29 ± 0,86	
Película de TPS con ZnO-NP Esférico (PZnOE)	Long.	1,28 ± 0,18	141,28 ± 11,62	7,42 ± 1,01	0,210 ± 0,02
	Tras.	1,12 ± 0,11	151,48 ± 7,74	5,45 ± 0,79	

Como se puede observar en el cuadro 16, la película que contenía ZnO-NPs con morfología acicular presentó mayores valores tanto de módulo de elasticidad como de resistencia máxima a la tensión, con un aumento en el módulo del 72,2 y 103% en sentido longitudinal y transversal, respectivamente, con relación a la película de TPS. Del mismo modo, la resistencia máxima de la película con nanorelleno se incrementó, considerablemente, al introducirle a la película Nanopartículas con esta morfología, aumentando este parámetro en un 96,6 y 72,4%, en los dos sentidos.

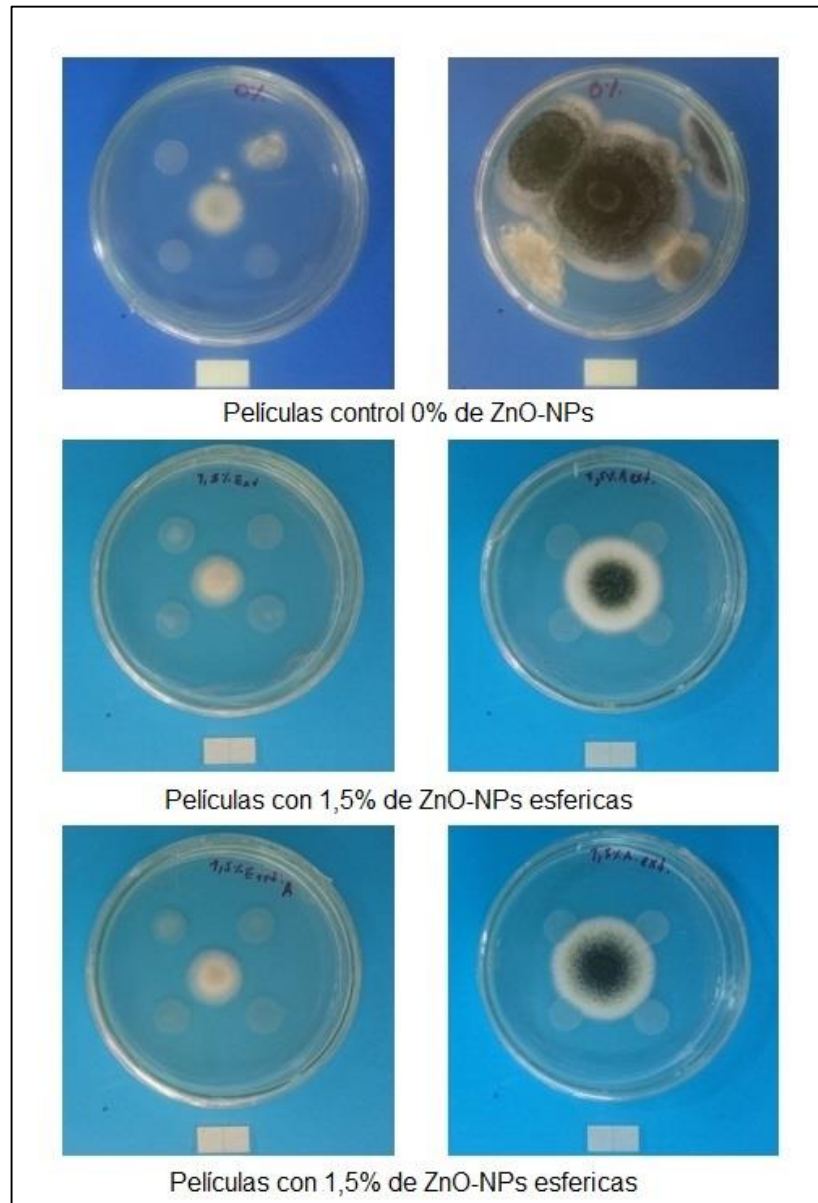
Debido a que no se encontró en la literatura científica un trabajo donde se estudie una película elaborada con composición similar a la de este trabajo, por el método de extrusión-soplado, para comparar el efecto propiciado por las ZnO-NPs sobre las propiedades mecánicas, se consideraron otros materiales diferentes al almidón de yuca. Cataño y colaboradores (Castaño *et al.*, 2013) encontraron que, con la incorporación de ZnO-NPs en películas de almidón de papa obtenidas por casting, se presentaba un aumento en la resistencia máxima a la tensión a partir de 1% (w/w) de nanorelleno incorporado. De igual forma, Marra y colaboradores (Marra, *et al.* 2016), desarrollaron películas basadas en PLA, por el método de extrusión para aplicaciones en el sector de envasado de alimentos, y encontraron que con la adición de ZnO-NPs, a partir de 1%, se obtenían propiedades mejoradas, tales como un aumento en el módulo de Young y en la resistencia máxima a la tensión; adicionalmente, ellos observaron efecto antimicrobiano en sus películas. Un estudio interesante realizado por Nafchi y colaboradores (Nafchi *et al.*, 2013) muestra cómo se incrementaban las propiedades mecánicas de las películas, elaboradas con almidón y gelatina, al incorporarles ZnO-NPs. Ellos reportaron un incremento en estas propiedades, a partir de 1% (w/w) de nanorelleno incorporado, evidenciándose un mayor efecto al incrementar la cantidad de ZnO-NPs incorporadas a las películas. Una justificación de este aumento en las propiedades mecánicas (Resistencia máxima a la tensión (MPa) y módulo de elasticidad (MPa)), por la adición de ZnO-NPs a la matriz de biopolímero, estaría relacionada con la interacción interfacial entre las nanopartículas y la matriz. En la literatura existen trabajos que indican que las propiedades mecánicas de las películas con nanorellenos son altamente dependientes de la interacción interfacial entre la matriz y las cargas (Ma *et al.*, 2009; Kanmani y Rhim, 2014 y Marra *et al.*, 2016).

Finalmente, los ensayos realizados mostraron que la elongación, en el punto de ruptura, aumentaba considerablemente añadiendo 1,5% (w/w) de ZnO-NPs con morfología acicular (159 y 241% en sentido longitudinal y transversal respectivamente) y esférica (193,8 y 250,5% en sentido longitudinal y transversal respectivamente) (Cuadro 16). Esto podría justificarse considerando que las partículas de ZnO en la formulación se podrían distribuir homogéneamente en la matriz polimérica contribuyendo a la generación de deformaciones elasto-plásticas, a su alrededor, favoreciendo un comportamiento elástico superior a la del TPS. La deformación elástica inicial pudo haber comenzado estadísticamente en cualquier

lugar de la muestra, pero es más probable donde existan imperfecciones locales, que puede ser alrededor de las nanopartículas. Cualquier muestra de polímero no es perfectamente homogénea: puede tener nano o micro vacíos, y/o micro dis-homogeneidad de densidad, y/o presencia de partículas de impurezas extrañas, y/o arañazos en las superficies de la muestra o en el borde de la película, etc. Todos estos son posibles puntos de partida para la deformación elástica inicial de tensión, ocasionando una cierta gama de módulo de Young y es por esto que el experimento de tensión requiere varias décimas de pruebas para obtener un valor promedio confiable. Cuando el mismo material contiene partículas añadidas intencionalmente, como ocurre en el presente caso con las ZnO-NPs, es muy probable que las deformaciones elásticas de tensión, de la mayoría de las muestras, se inicien en las interfaces del polímero con el óxido metálico, que son lugares de dishomogeneidad dentro de la muestra de polímero (Marra *et al.*, 2016). Esto permitiría explicar el fenómeno encontrado donde se observó un elevado porcentaje de elongación de las películas con NPs de ZnO. Debido a que las partículas con morfología esférica presentaban un menor tamaño (Imágenes SEM y MET numeral 4.1.4), esto facilitó su dispersión en la matriz polimérica, lo que justifica por qué el único parámetro que presentó mayor valor, en las películas que contenían ZnO-NPs con morfología esférica, fue la elongación final. Otro aspecto a considerar es que la propiedad higroscópica de la mezcla almidón, el plastificante y las ZnO-NPs condujo a la reducción de la rigidez del polímero, haciendo que el agua absorbida por las películas facilitara la movilidad de las cadenas de almidón, ocasionando un aumento de la elongación (Detyothin, 2012).

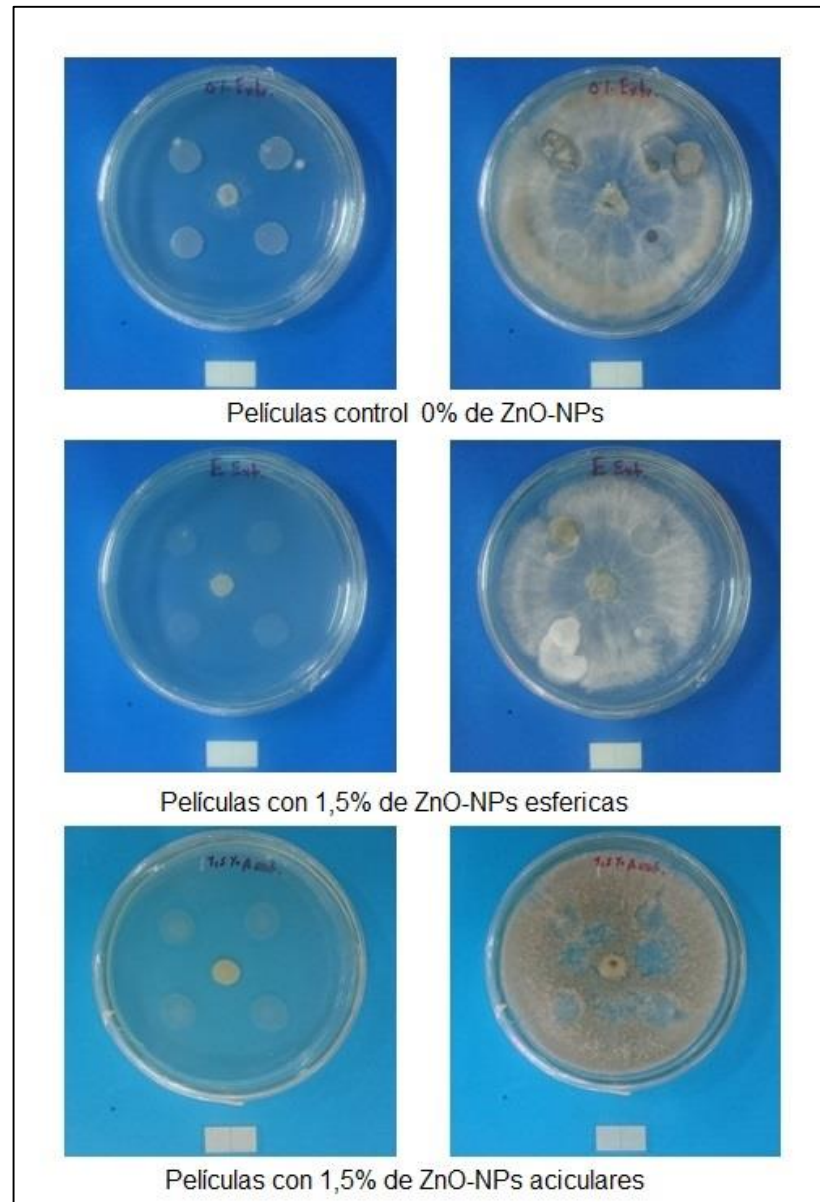
4.3.5. Determinación de la actividad antifúngica, *in vitro*, de las películas con almidón y ZnO-NPs obtenidas extrusión-soplado. en este caso, se realizó una comparación visual del crecimiento de los hongos sometidos a los tratamientos con las películas nanocompuestas; comparaciones que se muestran en las figuras 34 y 35. Debido a que los patrones de crecimiento de los hongos de este estudio, ya han sido analizados anteriormente, cuando son sometidos a la acción de las ZnO-NPs y las películas conformadas con las mismas (numeral 4.2.1. y 4.3.2). No fue necesario para este caso entrar en detalle en esta comparación de tratamientos. En la figura 34, se observa como el crecimiento del *A. niger* se ve inhibido con la presencia de las películas con 1,5% de ZnO-NPs en el medio de cultivo, presentándose un mayor efecto sobre el hongo con aquellas que contenían NPs con morfología esferoidal, esto atribuido a su mejor dispersión en la matriz polimérica.

Figura 34. Secuencia de imágenes que muestran el crecimiento del *Aspergillus niger* sometido a diferentes tratamientos con películas obtenidas por extrusión que contenían ZnO-NPs (de izquierda a derecha día 2 y 8 del ensayo).



Igual que en los ensayos realizados con películas elaboradas por casting (Numeral 4.3.2, Figuras 30 y 31), no se evidenció efecto alguno sobre el crecimiento del *Brotrytis cinera*. Este resultado indica que al incorporar las ZnO-NPs a la matriz polimérica por el método de extrusión-soplado no se presenta efecto antifúngico, sobre este hongo.

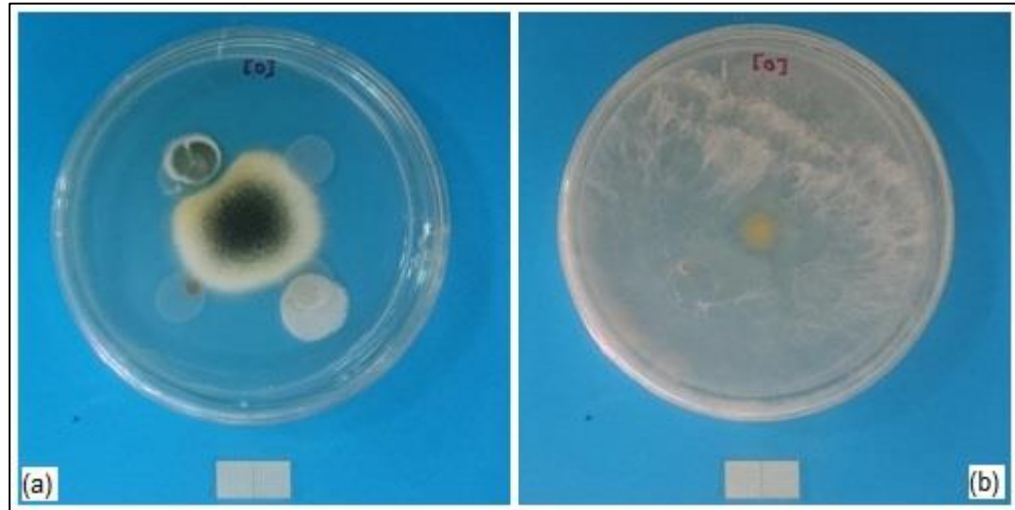
Figura 35. Secuencia de imágenes que muestra el crecimiento del *Botrytis cinerea* sometido a diferentes tratamientos con películas obtenidas por extrusión que contenían ZnO-NPs (de izquierda a derecha días 2 y 8 del ensayo).



Problemas de contaminación se presentaron en las películas de TPS (control) conformadas por extrusión, ya que al realizar el ensayo antifúngico, se evidenció el crecimiento de bacterias y hongos diferentes a las de este estudio (Figura 36), sobre la superficie de las películas y en el medio de cultivo, indicando que estas se vuelven

susceptibles a las condiciones normales de proceso, al convertirse en un vehículo de contaminación.

Figura 36. Contaminación presentada en los ensayos de actividad antifúngica con películas de TPS.



Con los resultados anteriores, se pudo establecer, que por el método de extrusión soplado es posible la obtención de películas con propiedades antifúngicas propiciadas por la adición del ZnO-NPs a la matriz polimerica, y que con valores mayores a 1,5% de NPs se logró inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger*.

5. CONCLUSIONES.

En este Trabajo de grado se estructuraron metodologías que permiten obtener, de manera controlada y reproducible, Nanopartículas de óxido de cinc con características predeterminadas.

El solvente utilizado en el proceso de síntesis del ZnO, ácido acético o etilenglicol, afectó apreciablemente las características del producto final: usando ácido acético se obtuvieron Nanopartículas de ZnO con morfología acicular y al emplear etilenglicol esferoidal. Además, los espectros IR y de absorción UV-vis presentaron diferencias, dependiendo del solvente de síntesis, lo que hace presagiar comportamientos diferentes cuando se considere una funcionalidad específica.

Se comprobó la acción antifúngica de las ZnO-NPs sintetizadas sobre las cepas *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea* y características fisicoquímicas de las Nanopartículas obtenidas, concretamente su morfología, las cuales tienen un efecto importante sobre esta funcionalidad. En el presente caso las ZnO-NPs con morfología acicular presentaron mayor actividad antifúngica que las NPs con morfología esferoidal. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de los métodos de síntesis utilizados para obtener las ZnO-NPs y sus características fisicoquímicas.

Las imágenes con microscopía óptica de alta resolución (MOAR) indican que se presentaron alteraciones en las estructuras reproductivas (conidióforos) e hifas de los hongos evaluados, cuando fueron sometidos a concentraciones de ZnO-NPs mayores a 6 mmol/L, produciendo un efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos.

La concentración mínima y óptima de NPs de ZnO en la película obtenida por extrusión, para inhibir la proliferación de la especie de hongo *A. niger* debe ser mayor al 1,5%. No es conveniente concentraciones de NPs superiores al 2,5% por el evidente aglomerado de ellas en las películas. Por otro lado, no fue posible inhibir el crecimiento de *B. cinerea* con ninguna de las películas evaluadas, debido a su morfología y patrón de crecimiento sobre el medio de cultivo.

Las películas elaboradas con ZnO-NPs obtuvieron mayores propiedades mecánicas respecto a la película de TPS. Presentándose un mayor incremento en el módulo de Young y resistencia máxima a la tensión en las películas formuladas con NPs de morfología acicular. La elongación final, estuvo más influenciada por la presencia de partículas de morfología esférica en la película. El incremento en estas

propiedades se debe principalmente, a la interacción interfacial entre las ZnO-NPs y la matriz del biopolímero.

Las propiedades de barrera de las películas, fueron influenciadas por la presencia de las ZnO-NPs en la matriz polimérica, encontrando un patrón de reducción tanto en la PVA como en la PO.

6. RECOMENDACIONES

Como segunda fase del proyecto, se recomienda realizar un estudio en el cual se evalúe el efecto sobre los cambios post cosecha de las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas de frutas y hortalizas empacadas en las películas nanocompuestas con ZnO-NPs obtenidas en este trabajo.

Realizar estudios acerca de la incidencia de distintas concentraciones de ZnO-NPs incluidas en películas elaboradas por extrusión-soplado, sobre sus propiedades mecánicas, de barrera, morfológicas y térmicas.

Llevar a cabo estudios de actividad antifúngica de las ZnO-NPs, y películas conformadas con ellas, sobre cepas de hongos y bacterias diferentes a las de este estudio.

Estudiar los posibles mecanismos de acción de las nanopartículas de ZnO sobre la célula fúngica.

Estudiar la posible migración de las ZnO-NPs, incorporadas a las películas activas, hacia el alimento.

Se recomienda elaborar una película flexible a partir de TPS, ácido poliláctico (PLA) y ZnO-NPs, para posteriormente estudiar el efecto del nanorelleno incorporado, sobre sus propiedades mecánicas y de barrera.

7. BIBLIOGRAFÍA.

ABREU, Ana; *et al.* Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. En: Carbohydrate Polymers. 2015. Vol. 129, p. 127-134.

ALCALDÍA MAYOR DE POPAYÁN. Nuestra geografía. [En línea] 2014. [Citado el 27 de noviembre de 2015]. Disponible en internet: <http://popayan.gov.co/ciudadanos/popayan/nuestra-geografia>.

ARBOLEDA, G. obtención de una película flexible a partir de almidón termoplástico de yuca (*manihot esculenta crantz*) y ácido poliláctico. Trabajo de grado Ingeniera Agroindustrial. Popayán, Cauca. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, 2014. p 12-40.

ASOCIACIÓN HORTIFRUTÍCOLA DE COLOMBIA (ASOHOFRUCOL). Balance y proyecciones del sector hortofrutícola. En: Revista Frutas y hortalizas, Bogotá febrero de 2014, no 33, p 10-14.

AVILA, Clemencia. Manual de laboratorio de fitopatología. Practicas sobre identificación, aislamiento y purificación de hongos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 2010. p. 17-43.

BOGUSH, G. H.; ZUKOSKI, C. F. “Uniform silica particle precipitation: an aggregative growth model”. En: Journal of Colloid Interface Science. 1991. Vol. 142, p. 19–34

CABALLERO, Mónica. Obtención y caracterización de películas poliméricas de almidón termoplástico/arcilla modificada con quitosano. Trabajo de grado Ingeniera Química. Bucaramanga, (Norte de Santander). Universidad industrial de Santander, facultad de ingenierías fisicoquímicas, escuela de ingeniería química. 2010, p. 3–20.

CANTÓN, Rafael, *et al.* Evaluation of the Wider system, a new computer-assisted image-processing device for bacterial identification and susceptibility testing. En: Journal of clinical microbiology. 2000, vol. 38, no 4, p. 1339-1346.

CARVALHO, Antonio. Starch: Major Sources, Properties and Applications as Thermoplastic Materials. En: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Mohamed Naceur Belgacem, 2008 p 321-342.

CASTAÑO, Patricia; LLAMAZARES, Saddys; AQUEVEQUE, Pedro; MALDONADO, Álvaro; RIQUELME, Silvia; PADILLA, Robinson; SANZANA, Johana. Películas biodegradables con propiedades antifúngicas en base a almidón y nanopartículas de ZnO. En: Revista Colombiana de Materiales. 2013. no 5, p 35-41.

CHEN, Youshuang, *et al.* Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α -amylase and glucoamylase. En: Carbohydrate Polymers. 2011, vol. 85, p. 272 - 275.

CORDEIRO DE AZEREDO, Henriette. Antimicrobial activity of nanomaterials for food packaging applications. En: Nano-antimicrobials: progress and prospects. 2012, p 375-394.

DANTIGNY, P y VAN, N. Nguyen y. Fungal Contamination in Packaged Foods. En: Antimicrobial Food Packaging. 2016, ed 1, p. 45-64.

DELGADO, Karen; MONTILLA, Camilo; VARONA, Alejandro. Efecto del Ácido Estéarico y Tween 80 en la Estabilidad de Películas Flexibles de Almidón de Yuca Termoplástico. Trabajo de grado Ingenieros Agroindustriales. Popayán, Cauca. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, 2013, p 12-13.

DETYOTHIN, S. Production and characterization of thermoplastic cassava starch, functionalized poly (lactic acid), and their reactive compatibilized blends. Trabajo de grado Doctor en Filosofía. Michigan. Michigan State University. 2012.

El Plan de Desarrollo para las frutas colombianas. [En línea] Bogotá 2015. En: revista Dinero. [Citado el 12 de Julio de 2015]. Disponible en internet: <<http://www.dinero.com/economia/articulo/el-plan-desarrollo-para-frutas-colombianas-2015/210527>>.

FAO, DEPÓSITO DE DOCUMENTOS. Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas. [En línea] Santiago (Chile) 2012. [Citado el 4 de

septiembre de 2015]. Disponible en internet: <<http://www.fao.org/docrep/x5056s/x5056S00.htm#Contents>>.

FDA. Part 182, Substances generally recognized as safe. [En línea] 2013. [Citado el 27 de noviembre de 2015]. Disponible en internet: <http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&sid=786bafc6f6343634fbf79fcdca7061e1&rgn=div5&view=text&node=21:3.0.1.1.13&idno=21#21:3.0.1.1.13.9>.

FOOLMAUN, Rajendra Kumar y RAMJEEAWON, Toolseeram Comparative life cycle assessment and life cycle costing of four disposal scenarios for used polyethylene terephthalate bottles in Mauritius En: Environmental Technology. 2012, vol. 33, No. 17, p. 2007–2018.

FROST, K. Thermoplastic Starch Composites and Blends. Trabajo de grado Doctor de Filosofía. Escuela de Ciencias Aplicadas. Colegio de Ciencia, Ingeniería y Salud. Universidad RMIT, 2010.

GATTO, Maria Antonia, *et al.* Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. En: Postharvest Biology and Technology. 2011, vol. 61, p 72-82.

HE, Lili; LIU, Yang; MUSTAPHA, Azlin; LIN, Mengshi. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. En: Microbiological Research. 2011, vol. 166, p 207-215.

HEYDARI, Amir; ALEMZADEH, Iran; VOSSOUGH, Manouchehr. Functional properties of biodegradable corn starch nanocomposites for food packaging applications. En: Materials & Design. 2013, vol. 50, p. 954-961.

IBARRA, V; SENDÓN, R y RODRÍGUEZ, Bernaldo. Antimicrobial Food Packaging Based on Biodegradable Materials. En: Antimicrobial Food Packaging. 2016, ed 1, p. 363-384.

INFOAGRO. Deterioro de las frutas y hortalizas frescas en el periodo de poscosecha. [En línea] Madrid (España) 2013. [Citado el 1 de Octubre de 2015]. Disponible en internet: <http://www.infoagro.com/frutas/deterioro_poscosecha_frutas_hortalizas.htm>.

INSUASTY, Alexandra; PERDOMO, Paola. Efecto de recubrimiento a base de propóleo y proteína de soya sobre la calidad de la fresa (*fragaria x ananassa duch*). Trabajo de grado Ingeniera Agroindustrial. Popayán, Cauca. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, 2015. p 19-35.

JANAKI, A. Chinnammal; SAILATHA, E.; GUNASEKARAN, S. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. En: Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015, vol. 144, p. 17-22.

JUÁREZ BECERRA G, P; SOSA MORALES, M E; LÓPEZ MALO Aurelio. Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: Descripción y métodos de control. En: temas selectos de ingeniería de alimentos. 2010, vol 2-4, p 14-23.

KANMANI, Paulraj y RHIM, Jong-Whan. Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. En: Carbohydrate polymers, 2014, vol. 106, p. 190-199.

KANMANI, Paulraj; RHIM, Jong-Whan. Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles. En: Carbohydrate polymers. 2014, vol. 106, p 190-199.

KHORSANDZAK, Ali; SUHAILI, Nur; HASHIM, Abdul y KORDI, Frouzan. A XPS and UV–vis studies of Ga-doped zinc oxide nanoparticles synthesized by gelatin based sol-gel approach. En: Ceramics International. 2016. Vol. 42, p. 13605–13611.

LESCHER, Peter. Moulding of Water-Free Thermoplastic Starch Blends. Trabajo de grado Doctor en Filosofía en Ingeniería. Auckland, Nueva Zelanda. Departamento de Ingeniería Mecánica. Facultad de Ingeniería. Universidad de Auckland, 2010.

LOPES, Franceline Aparecida, et al. Conservation of bakery products through cinnamaldehyde antimicrobial films. En: Packaging Technology and Science. 2014, vol. 27, no 4, p. 293-302.

LÓPEZ, Olivia V., et al. Food packaging bags based on thermoplastic corn starch reinforced with talc nanoparticles. En: Food Hydrocolloids. 2015, vol. 43, p. 18-24.

MA, Hongbo, et al. Impact of solar UV radiation on toxicity of ZnO nanoparticles through photocatalytic reactive oxygen species (ROS) generation and photo-induced dissolution. En: Environmental Pollution. 2014, vol. 193, p. 165-172.

MA, X.; CHANG, P. R.; YANG, J., y YU, J. Preparation and properties of glycerol plasticized-pea starch/zinc oxide-starch bionanocomposites. En: Carbohydrate Polymers. 2009. Vol. 75, p.472–478.

MARRAA, Antonella; SILVESTREA, Clara; DURACCIOB, Donatella y CIMMINOA, Sossio. Polylactic acid/zinc oxide biocomposite films for food packaging application. En: International Journal of Biological Macromolecules. 2016 Vol. 88, p. 254–262.

MOHAMMADI, Abdorreza; MORADPOUR, Mahdiyeh; SAEIDI, Maliheh; KARIM, Abd. Thermoplastic starches: Properties, challenges and prospects. En: Starch. 2013, vol. 65, p 61-72.

MOMIN, Jafarali K. y JOSHI, B. H. Nanotechnology in Foods. En: Nanotechnologies in Food and Agriculture. Springer International Publishing, 2015. p. 3–24.

MONCADA, Edwin. Nanotecnología, aplicaciones en embalajes para alimentos y productos farmacéuticos. En: Revista de la facultad de química farmacéutica Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2007, vol 14, no. 2, p 114-120.

MONTERO MUÑOZ, Marly., RODRÍGUEZ, Jorge Enrique y ANACONA, Gentil. El óxido de cinc (ZnO): Síntesis y usos tecnológicos. En: Capacidad fotodegradante de las nanopartículas de ZnO. 2012, ed.1, p. 25-78.

MOŚCICKI, Leszek; MITRUS, Marcin; WÓJTOWICZ, Agnieszka; ONISZCZUK, Tomasz; REJAK, Andrzej; JANSSEN, Leon. Application of extrusion-cooking for processing of thermoplastic starch (TPS). En: Food Research International. Julio, 2012, vol. 47, no. 2, p 291-299.

MÜLLER, C; LAURINDO, J y YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. En: Carbohydrate Polymers. 2009. Vol 77, p. 293–299.

NAFCHI, Abdorreza; KARIM, Abd; MAHMUDC, Shahrom; ROBAL Marju. Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. En: Journal of Food Engineering. 2012, vol 113, p 511-519.

NAFCHI, Abdorreza; NASSIRI, Roghayeh; SHEIBANI, Samira; ARIFFIN Fazilah. KARIM, A. A. Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. En: Carbohydrate Polymers. 2013, vol 96, p 233-239.

NAKAMOTO, Kazuo. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds” Part A: Theory and applications in inorganic chemistry. 5th edition, Jhon Wiley & Sons, Inc., New York 1997.

NAVARRO, Enrique, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. En: Ecotoxicology. 2008, vol. 17, no 5, p. 372-386.

NAVARRO, Enrique, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. En: Ecotoxicology. 2008, vol. 17, no 5, p. 372-386.

OCAÑA, Diego. Estudio del proceso de elaboración de arroz crocante por extrusión. Trabajo de grado Ingeniero de Alimentos. Quito. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de Ciencias de la Ingeniería, 2013.

OLIVEIRA, Jaqueline; SCHEIBE Ana Silvia; SERENO Albert; BORGES, João. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. En: Journal of Food Engineering. 2013 Vol. 119, p. 800–808.

OSUNA, Guillermo; TIRADO, José; VALDEZ, Octavio. *Aspergillus niger* en tomate. [En línea] 2013. [Citado el 3 de octubre de 2015]. Disponible en internet: <<https://prezi.com/b6t7lvmltidy/aspergillus-niger-en-tomate/>>.

PASQUET, Julia, et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five microorganisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. En: International Journal of Pharmaceutics. 2014, vol. 460, p. 92- 100.

PEREZ ESPITIA, Paula Judith, OTONI, Caio Gomide y FERREIRA SOARES Nilda de Fátima. Zinc Oxide Nanoparticles for Food Packaging Applications. En: Antimicrobial Food Packaging, 2016, p. 425–431.

POONSUB, T; CHANIKARN W. y WIRAWAN I. Effect of TiO₂ and ZnO on Thin Film Properties of PET/PBS Blend for Food Packaging Applications. En: Energy Procedia. 2014. Vol. 56, p. 102–111.

PROCOLOMBIA. Inversión en el sector hortofrutícola en Colombia. [En línea] Bogotá 2013. [Citado el 10 de Junio de 2015]. Disponible en internet: <<http://inviertaencolombia.com.co/sectores/agroindustria/hortofruticola.html>>.

QUINTERO, Rafael M. Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas, estudio de su impacto mediante aproximación metabólica y evaluación de la calidad poscosecha. Tesis Doctorado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias: Bioorgánica. Medellín Colombia. Universidad de Antioquia, 2012. p. 20-21, 136-137.

RAJIV, P; RAJESHWARI, Sivaraj y VENCKATESH, Rajendran. Bio-Fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. En: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013, Vol.103, p. 143– 148.

RODERO, L., *et al.* Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. En: Revista Argentina de Microbiología. 2006, Vol. 38, p. 155-163.

RODRÍGUEZ - PÁEZ. J. E. Estudio de los mecanismos de formación de partículas de ZnO con diseño morfológico y dimensiones obtenidas por el método de precipitación controlada. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España. 1999.

ROJAS, M. Estudio de las características fisicoquímicas de la yuca (*Manihot esculenta crantz*) y sus efectos en la calidad de hojuelas fritas para su procesamiento en la empresa Pronal S.A. Trabajo de grado Tecnóloga Química. Pereira, Risaralda. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Escuela de Química, 2012, p 9.

SALARBASHI, Davoud, *et al.* Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporating ZnO nanoparticles. En: Carbohydrate Polymers, 2016, vol. 140, p. 220-227.

SHARMA, Ravi Kant; GHOSE, Ranjana. Synthesis of zinc oxide nanoparticles by homogeneous precipitation method and its application in antifungal activity against *Candida albicans*", En: Ceramics International. 2015, vol. 41, p 967-975.

SILVA, Nerin; MANSO, S. y BECERRIL, R. The Downside of Antimicrobial Packaging: Migration of Packaging Elements into Food. . En: Antimicrobial Food Packaging. 2016, ed 1, p. 81-94.

SIRACUSA, V. Packaging Material in the Food Industry. En: Antimicrobial Food Packaging. 2016, ed 1, p. 95-106.

SOUZA, A. C. *et al.*, 2013. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. En: LWT-Food Science and Technology 54, p 346-352.

STOIMENOV, Peter; KLINGER, Rosalyn; MARCHIN, Geroge; KLABUNDE, Kenneth. Metal oxide nanoparticles as bacterial agents. En: Lagnmuir JACS. 2002, vol. 18, no 17, p. 6679-6686.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES. Descripción DE LA Técnica MEB. [En línea] 2014. [Citado el 27 de noviembre de 2015]. Disponible en internet: <https://investigaciones.uniandes.edu.co/index.php/es/centro-de-microscopia/microscopio-electronico-de-barrido-meb/descripcion-de-la-tecnica-meb>.

VAN, N. Nguyen y DANTIGNY, P. Fungal Contamination in Packaged Foods. En: Antimicrobial Food Packaging. 2016, ed 1, p. 45-64.

VARGAS, Alexander. Comparacion del efecto antibacteriano de nanoparticulas de ZnO de diferente morfologia sobre *Escherichia coli*. Trabajo de grado químicos. Popayán, Cauca. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Exactas Naturales y de la Educación. Departamento de Química, 2016, p. 6-20.

VERA, Javier; KELLY, Adrian; BROWN, Elaine; COATES, Phil. Thermal optimisation of polymer extrusion using in-process monitoring techniques. En: Applied Thermal Engineering. Mayo, 2013, vol. 53, no. 2, p 405-413.

VILLADA, Héctor; ACOSTA, Harold; VELASCO, Reinaldo. Investigación de almidones termoplásticos, precursores de productos biodegradables. [En Línea] Cali (Colombia) 2008. [Citado el 12 de abril de 2015]. Disponible en internet: Disponible en internet: <http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v19n2/art02.pdf>.

VILLALOBOS, José; CÁRDENAS, Franklin; CORDERO, Juan. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica. Inventario de enfermedades en cultivos agrícolas. [En línea] San José (Costa Rica) 2009. [Citado el 1 de octubre de 2015]. Disponible en internet: <https://www.sfe.go.cr/tramites/Lista_de_plagas_agricolas_y_forestales_de_CR.pdf> p 12-74.

WOGGUM, Thewika; SIRIVONGPAISAL, Piyarat; WITTAYA, Thawien. Properties and characteristics of dual-modified rice starch based biodegradable films. En: International Journal of Biological Macromolecules. Junio, 2014. vol. 67, p 490-502.

YAGCI, Sibel; GOGUS, Fahrettin. Development of extruded snack from food by-products: a response surface analysis. En: Journal of Food Process Engineering. 2009, vol. 32, p 565-586.

YANG, Qingbo y MA, Yinfa. Irradiation-Enhanced Cytotoxicity of Zinc Oxide nanoparticles. En: International Journal of Toxicology, 2014, vol. 33, ed. 3, p. 187-203.

ZHANG, Xin; CHEN, Haixia; ZHANG, Ning; CHEN, Shuhan. TIAN, Jingge. ZHANG, Yu; WANG, Zhaoshuai. Extrusion treatment for improved physicochemical and antioxidant properties of high-molecular weight polysaccharides isolated from coarse tea. En: Food Research International. Octubre, 2013, vol. 53, no. 2, p 726-731.

ZOLFI, Mohsen, et al. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. En: Carbohydrate polymers. 2014, vol. 109, p. 118-125.

ANEXOS

ANEXO A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PRUEBAS DE PERMEABILIDAD DE PELICULAS DE ALMIDÓN Y ZnO-NPs.

Anexo A1. Prueba de normalidad.

Variable	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA	PC	0,988	3	0,793
	PZnOA	0,985	3	0,763
	PZnOE	1,000	3	1,000
PERMEABILIDAD AL OXIGENO	PC	0,982	3	0,745
	PZnOA	1,000	3	0,969
	PZnOE	0,916	3	0,440

Anexo A2. Anova de un factor, para pruebas de permeabilidad.

Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	PO	0,390 ^a	2	0,195	258,963	0,000
	PVA	1,238 ^a	2	0,619	114,122	0,000
Intersección	PO	1,521	1	1,521	2021,502	0,000
	PVA	8,282	1	8,282	1526,789	0,000
Tratamiento (Tipo de Nanopartícula)	PO	0,390	2	0,195	258,963	0,000
	PVA	1,238	2	0,619	114,122	0,000
Error	PO	0,005	6	0,001		
	PVA	0,033	6	0,005		
Total	PO	1,915	9			
	PVA	9,552	9			
Total corregida	PO	0,394	8			
	PVA	1,271	8			

Anexo A3. Prueba de homogeneidad de varianzas, para pruebas de permeabilidad

Sentido longitudinal				
Variable	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
PO	0,060	2	6	0,942
PVA	2,724	2	6	0,144

Anexo A4. Comparación múltiple de Tukey. Para pruebas de permeabilidad.

PERMEABILIDAD AL OXIGENO				
Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
PZnOA	3	1,56035E-16		
PZnOE	3		4,11459E-16	
PC	3			6,65695E-16

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA			
Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
PZnOA	3	6,16385E-11	
PZnOE	3	7,869E-11	
PC	3		1,47446E-10

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PRUEBAS DE TENSION DE PELICULAS DE ALMIDON Y ZnO-NPs.

Anexo B1. Prueba de normalidad. Sentido longitudinal.

Variable	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Módulo de elasticidad (MPa)	PC	0,983	3	0,751
	PZnOA	0,959	3	0,610
	PZnOE	0,819	3	0,160
Resistencia máxima a la tensión (MPa)	PC	0,966	3	0,647
	PZnOA	0,959	3	0,609
	PZnOE	0,876	3	0,313
Elongación máxima en el punto de rotura (%)	PC	0,829	3	0,185
	PZnOA	0,849	3	0,237
	PZnOE	0,990	3	0,806

Anexo B2. Prueba de normalidad. Sentido transversal.

Variable	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Módulo de elasticidad (MPa)	PC	0,875	3	0,311
	PZnOA	0,989	3	0,804
	PZnOE	0,965	3	0,638
Resistencia máxima a la tensión (MPa)	PC	0,979	3	0,722
	PZnOA	0,955	3	0,592
	PZnOE	0,937	3	0,517
Elongación máxima en el punto de rotura (%)	PC	0,859	3	0,264
	PZnOA	0,993	3	0,838
	PZnOE	0,895	3	0,371

Anexo B3. Anova de un factor para sentido transversal y longitudinal.

Sentido longitudinal						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Módulo	34,243 ^a	2	17,122	203,001	0,000
	ResTensión	1,111 ^a	2	0,556	41,970	0,000
	Elongación	14834,364 ^a	2	7417,182	648,547	0,000
Intersección	Módulo	609,525	1	609,525	7226,789	0,000
	ResTensión	15,442	1	15,442	1166,208	0,000
	Elongación	98668,283	1	98668,283	8627,397	0,000
Tratamiento (Tipo de Nanopartícula)	Módulo	34,243	2	17,122	203,001	0,000
	ResTensión	1,111	2	0,556	41,970	0,000
	Elongación	14834,364	2	14834,364	648,547	0,000
Error	Módulo	0,506	6	0,084		
	ResTensión	0,079	6	0,013		
	Elongación	68,620	6	11,437		
Total	Módulo	644,275	9			
	ResTensión	16,633	9			
	Elongación	113571,267	6			
Total corregida	Módulo	34,749	8			
	ResTensión	1,191	8			
	Elongación	14902,983	8			
Sentido transversal						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Módulo	20,503 ^a	2	10,251	100,765	0,000
	ResTensión	0,431 ^a	2	0,215	127,421	0,000
	Elongación	22667,568 ^a	2	11333,784	2959,521	0,000
Intersección	Módulo	267,105	1	267,105	2625,517	0,000
	ResTensión	9,082	1	9,082	5372,776	0,000
	Elongación	117295,108	1	117295,108	30628,548	0,000
Tratamiento	Módulo	20,503	2	10,251	100,765	0,000
	ResTensión	0,431	2	0,215	127,421	0,000
	Elongación	22667,568	2	11333,784	2959,521	0,000
Error	Módulo	0,610	6	0,102		
	ResTensión	0,010	6	0,002		
	Elongación	22,978	6	3,830		
Total	Módulo	288,218	9			
	ResTensión	9,523	9			
	Elongación	139985,653	9			
Total corregida	Módulo	21,113	8			
	ResTensión	0,441	8			
	Elongación	22690,546	8			

Anexo B4. Prueba de homogeneidad de varianzas.

Sentido longitudinal				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Módulo Elasticidad	1,915	2	6	0,227
Resistencia	2,766	2	6	0,141
Elongación	3,838	2	6	0,084
Sentido transversal				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Módulo Elasticidad	0,308	2	6	0,746
Resistencia	3,438	2	6	0,101
Elongación	1,195	2	6	0,366

Anexo B5. Comparación múltiple de Tukey.

Anexo B5.1. Módulo de Young (MPa).

Sentido longitudinal				
Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
PC	3	6,3470		
PZnOE	3		7,4245	
PZnOA	3			10,9170
Sentido transversal				
	N	Subconjunto		
		1	2	3
PC	3	3,5951		
PZnOE	3		5,4560	
PZnOA	3			7,2922

Anexo B5.2. Resistencia Máxima a la Tensión (MPa).

Sentido longitudinal				
Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
PC	3	0,8947		
PZnOE	3		1,2808	
PZnOA	3			1.7540

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA			
Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
PC	3	0,6975	
PZnOE	3		1,1249
PZnOA	3		1,1912

Anexo B5.3. Porcentaje de Elongación.

Sentido longitudinal				
Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
PC	3	48,0892		
PZnOA	3		124,7438	
PZnOE	3			141,2821
Sentido transversal				
		Subconjunto		
		1	2	3
PC	3	43,2200		
PZnOA	3		147,7791	
PZnOE	3			151,4847

Anexo B6. Prueba T Student.

Anexo B6.1. Prueba T Student propiedades mecánicas de tensión de películas de TPS (Control).

Sentido longitudinal						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Módulo de elasticidad (MPa)	Se han asumido varianzas iguales	0,080	0,792	-12,615	4	0,000
Resistencia máxima a la tensión (MPa)	Se han asumido varianzas iguales	0,638	0,469	-8,393	4	0,001
Elongación máxima (%)	Se han asumido varianzas iguales	0,638	0,469	-8,393	4	0,092

Anexo B6.2. Prueba T Student propiedades mecánicas de tensión de películas de TPS con ZnO-NPs Acicular.

Sentido longitudinal						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Módulo de elasticidad (MPa)	Se han asumido varianzas iguales	0,191	0,685	-12,264	4	0,000
Resistencia máxima a la tensión (MPa)	Se han asumido varianzas iguales	2,323	0,202	-5,752	4	0,005
Elongación máxima (%)	Se han asumido varianzas iguales	2,606	0,182	8,080	4	0,001

Anexo B6.3. Prueba T Student propiedades mecánicas de tensión de películas de TPS con ZnO-NPs Esférica.

Sentido longitudinal						
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias		
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)
Módulo de elasticidad (MPa)	Se han asumido varianzas iguales	3,762	0,124	-8,705	4	0,001
Resistencia máxima a la tensión (MPa)	Se han asumido varianzas iguales	9,249	0,038	-2,250	4	0,088
Elongación máxima (%)	Se han asumido varianzas iguales	2,688	0,176	6,774	4	0,002