
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD MADERO
División de Estudios de Posgrado e Investigación



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE
QUITOSANO-ALMIDÓN CON ANTIOXIDANTES NATURALES**

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN MATERIALES

Presenta:

M.C. Jessica Ismalé Lozano Navarro
D-04070487

Directora de Tesis:

Dra. Nancy Patricia Díaz Zavala

Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Velasco Santos

Cd. Madero, Tamps.

Mayo de 2017

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Cd. Madero, Tamps; a **08 de Mayo de 2017.**

OFICIO No.: U3.067/17
AREA: DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN
DE TESIS

M.C. JESSICA ISMALÉ LOZANO NAVARRO
NO. DE CONTROL D04070487

PRESENTE

Me es grato comunicarle que después de la revisión realizada por el Jurado designado para su examen de grado de Doctorado en Ciencias en Materiales, el cual está integrado por los siguientes catedráticos:

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| PRESIDENTE: | DRA. NANCY PATRICIA DÍAZ ZAVALA |
| SECRETARIO: | DR. CARLOS VELASCO SANTOS |
| VOCAL 1: | DR. ULISES PÁRAMO GARCÍA |
| VOCAL 2: | DRA. ADRIANA ISABEL REYES DE LA TORRE |
| VOCAL 3: | DR. JOSÉ AARÓN MELO BANDA |
| SUPLENTE: | DR. JOSE LUIS RIVERA ARMENTA |

Se acordó autorizar la impresión de su tesis titulada:

"SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO-ALMIDÓN CON ANTIOXIDANTES NATURALES"

Es muy satisfactorio para la División de Estudios de Posgrado e Investigación compartir con Usted el logro de esta meta.

Espero que continúe con éxito su desarrollo profesional y dedique su experiencia e inteligencia en beneficio de México.

ATENTAMENTE

"POR MI PATRIA Y POR MI BIEN"®



DRA. ADRIANA ISABEL REYES DE LA TORRE
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD MADERO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

c.c.p.- Archivo
Minuta

AIRT 'UPG' jar

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"



Ave. 1° de Mayo y Sor Juana I. de la Cruz Col. Los Mangos, C.P. 89440 Cd. Madero, Tam.
Tel. (833) 357 48 20. e-mail: itcm@itcm.edu.mx
www.itcm.edu.mx



Resumen

El propósito de esta investigación fue el desarrollo de nuevos materiales biocidas a partir de soluciones acuosas de quitosano (cuyo poder biocida ha quedado demostrado en múltiples investigaciones) y almidón, a las cuales se le añadió extractos a partir de arándano rojo, arándano morado, betabel, granada, orégano, pitaya y uva (los cuales contienen diversos antioxidantes tales como antocianinas, betalaínas, timol, carvacrol y resveratrol).

Estos materiales lograron la inhibición de diversos microorganismos indicadores de patógenos en alimentos y medio ambiente: mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos del genero *Penicillium* y *Aspergillus*.

Las películas fueron caracterizadas mediante diversas técnicas: químico-estructurales: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, Espectroscopía Ultravioleta-Visible y Espectroscopía Raman; morfológica: Microscopía Electrónica de Barrido; mecánica: Análisis Dinámico Mecánico; térmica: Análisis Termogravimétrico, y otras como medición de espesor, medición de pH y densidad aparente, con el objetivo de estudiar el efecto de los extractos en la estructura química, propiedades ópticas, morfología, propiedades mecánicas, propiedades térmicas y características físicas.

En esta investigación, las películas que contienen 2 y 5% (v/v) de cada extracto (con excepción de pitaya, la cual fue mejor en concentración de 0.5% v/v) lograron los mejores resultados en las pruebas antimicrobianas. Los resultados de las caracterizaciones indican que la adición de extractos mejora las propiedades ópticas, mecánicas y térmicas de las películas de quitosano-almidón. No se observa una relación entre la morfología y la actividad antimicrobiana. También se encuentra que los extractos naturales aumentaron el espesor de las películas y que están presentaban un pH ácido (el cual es adecuado para tener una mejor interacción con la matriz de las películas), se confirma que existe una interacción entre el tipo de antioxidante, la concentración de extracto y el día de medición de pH. En particular, las mejores películas fueron aquellas que contienen arándano rojo, arándano morado, betabel y granada.

Abstract

The purpose of this research was the development of new biocidal materials from chitosan aqueous solution (whose biocidal power has been demonstrated in many investigations) and starch aqueous solution, to which extracts were added from cranberry, blueberry, beetroot, pomegranate, oregano, dragon fruit and grape (which contain various antioxidants such as anthocyanins, betalains, thymol, carvacrol and resveratrol).

These materials achieved the inhibition of various pathogens indicator microorganisms in food and environment: aerobic mesophilic bacteria, total coliforms and *Penicillium* and *Aspergillus* fungi.

The films were characterized by several techniques: chemical-structural: Infrared Spectroscopy by Fourier Transform, Ultraviolet-Visible Spectroscopy and Raman Spectroscopy; Morphology: Scanning Electron Microscopy; Mechanics: Dynamic Mechanical Analysis; Thermal analysis: Thermogravimetric analysis, and others as thickness measurement, pH measurement and apparent density, with the objective of studying the effect of extracts on chemical structure, optical properties, morphology, mechanical properties, thermal properties and physical characteristics.

In this investigation, films containing 2 and 5% (v / v) of each extract (with the exception of pitaya, which was better at 0.5% v / v concentration) achieved the best results in the antimicrobial tests. The results of the characterizations indicate that the addition of extracts improves the optical, mechanical and thermal properties of the chitosan-starch films. There is no relationship between morphology and antimicrobial activity. It is also found that the natural extracts increased the thickness of the films and that they presented an acidic pH (which is convenient to have a better interaction with the matrix of the films), confirmation that there is an interaction between the type of antioxidant, concentration of extract and the day of pH measurement. In particular, the best films were those that contain cranberry, blueberry, beetroot and pomegranate.

Justificación

En la industria alimenticia el quitosano ofrece un amplio espectro de posibles aplicaciones, destacándose como agente antimicrobiano, antioxidante y como embalaje activamente funcional (aplicado a las frutas y vegetales), el cual reduce la pérdida de agua e incrementa la vida media del producto.

El empleo del quitosano como biomaterial ofrece una alternativa al uso de materiales sintéticos, los cuales no son biodegradables y ocasionan graves problemas ambientales.

El quitosano de medio peso molecular presenta buenas propiedades para la formación de películas, debido a la formación de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares.

Asimismo, se utilizaron diversos y nuevos antioxidantes obtenidos de especias, frutas y verduras con el propósito de aumentar las propiedades antimicrobianas del quitosano; estos materiales no son tóxicos, son abundantes en la naturaleza, tienen propiedades antimicrobianas y el costo de producción de estas películas es relativamente barato.

Objetivos

Objetivo general

- Sintetizar y caracterizar películas poliméricas base quitosano almidón modificadas con diferentes antioxidantes naturales que aporten un efecto biocida a los nuevos materiales sintetizados.

Objetivos específicos

- Elaborar películas a base de quitosano-almidón modificadas con diferentes antioxidantes naturales.
- Caracterizar mediante DMA en cuanto a sus propiedades viscoelásticas, TGA para determinar su estabilidad térmica, SEM para observar morfología superficial, UV-Vis para el estudio de la presencia y cantidad de antioxidantes así como las propiedades ópticas, Raman para analizar la estructura, medición de pH, espesor y densidad aparente para analizar propiedades de las películas, y FTIR para identificar grupos funcionales.
- Medir la actividad biocida de las películas quitosano- almidón - antioxidantes, aplicando el método de cultivo apropiado, usando colonias de distintos microorganismos: bacterias, hongos y levaduras.

Hipótesis

El uso de antioxidantes provenientes de diversas especias, frutas y hortalizas refuerzan las propiedades antimicrobianas de las películas de quitosano-almidón, también existe una modificación de las propiedades ópticas, mecánicas y térmicas, permitiéndoles ser materiales aptos para el embalaje de alimentos.

Índice

| | Página |
|---------------------------------|---------------|
| Resumen | i |
| Abstract | ii |
| Justificación | iii |
| Objetivos | iii |
| Objetivo general | iii |
| Objetivos específicos | iv |
| Hipótesis | iv |
| Índice | v |
| Índice de Figuras | x |
| Índice de Tablas | xv |
| | |
| Introducción | 1 |
| | |
| Capítulo 1 Marco Teórico | 3 |
| 1.1 Quitosano | 3 |
| 1.2 Almidón | 5 |
| 1.3 Ácido acético | 8 |
| 1.4 Glicerol | 9 |
| 1.5 Arándano rojo | 9 |
| 1.6 Arándano morado | 11 |
| 1.7 Betabel | 12 |

| | |
|--|-----------|
| 1.8 Granada | 13 |
| 1.9 Orégano | 14 |
| 1.10 Pitaya | 15 |
| 1.11 Antioxidantes naturales | 17 |
| 1.11.1 Antocianinas | 18 |
| 1.11.2 Betalaínas | 20 |
| 1.11.3 Timol | 21 |
| 1.11.4 Carvacrol | 21 |
| 1.11.5 Resveratrol | 22 |
| 1.12 Bacterias | 24 |
| 1.12.1 Mesofílicos aerobios | 25 |
| 1.12.2 Coliformes | 26 |
| 1.13 Hongos | 27 |
| 1.13.1 <i>Penicillium notatum</i> | 28 |
| 1.13.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> | 29 |
| 1.13.3 <i>Aspergillus niger</i> | 30 |
| 1.14 Antecedentes | 31 |
| Capítulo 2 Metodología Experimental | 41 |
| 2.1 Materiales | 41 |
| 2.2 Síntesis de películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3 Incorporación de antioxidantes naturales | 43 |
| 2.4 Pruebas antimicrobianas | 43 |
| 2.4.1 Pruebas de contaminación previa | 44 |
| 2.4.2 Cultivo de mesofílicos aerobios | 44 |
| 2.4.3 Cultivo de coliformes | 45 |
| 2.4.4 Cultivo de hongos | 45 |
| 2.5 Métodos de caracterización | 46 |
| 2.5.1 Medición de espesor | 47 |
| 2.5.2 Densidad aparente | 47 |
| 2.5.3 Medición de potencial de hidrógeno (pH) | 48 |
| 2.5.3 Propiedades ópticas (transparencia y opacidad) | 49 |
| 2.5.5 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) | 49 |
| 2.5.6 Espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis) | 50 |
| 2.5.7 Espectroscopía Raman | 52 |
| 2.5.8 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) | 52 |
| 2.5.9 Análisis Dinámico Mecánico (DMA) | 53 |
| 2.5.10 Análisis Termogravimétrico (TGA) | 53 |
| 2.5.11 Análisis estadístico | 54 |
| Capítulo 3 Resultados y Discusión | 55 |
| 3.1 Identificación de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales. | 55 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.1 Características de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales. | 55 |
| 3.1.2 Cambio de coloración de las películas | 60 |
| 3.2 Pruebas antimicrobianas | 61 |
| 3.2.1 Identificación de microorganismos | 61 |
| 3.2.2 Pruebas de contaminación previa | 63 |
| 3.2.3 Pruebas antimicrobianas contra mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos. | 65 |
| 3.2.3.1 Actividad contra mesofílicos aerobios | 66 |
| 3.2.3.2 Actividad contra coliformes | 67 |
| 3.2.3.3 Actividad contra hongos | 68 |
| 3.2.3.4 Mecanismos propuestos de actividad antimicrobiana de las películas | 70 |
| 3.3 Medición de espesor | 72 |
| 3.4 Densidad aparente | 74 |
| 3.5 Medición de potencial de hidrógeno (pH) | 75 |
| 3.6 Propiedades ópticas (transparencia y opacidad) | 81 |
| 3.7 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) | 83 |
| 3.8 Espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis) | 87 |
| 3.9 Espectroscopía Raman | 91 |
| 3.10 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) | 93 |
| 3.11 Análisis Dinámico Mecánico (DMA) | 106 |

| | |
|---|------------|
| 3.11.1 Módulo de almacenamiento (E') | 106 |
| 3.11.2 Temperatura de transición vítrea (T_g) utilizando DMA | 109 |
| 3.12 Análisis Termogravimétrico (TGA) | 112 |
| Capítulo 4.0 Conclusiones | 114 |
| Referencias | 117 |
| Anexo 1 Referencias de las imágenes pertenecientes a otros autores | 134 |
| Anexo 2 Artículo Publicado | 135 |

Índice de Figuras

| Figura | Descripción | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1.1 | Estructura química de quitina y quitosano. | 4 |
| 1.2 | Estructura química del almidón. | 5 |
| 1.3 | Estructura química de la amilosa | 6 |
| 1.4 | Estructura química de la amilopectina. | 6 |
| 1.5 | Gelatinización del almidón. | 7 |
| 1.6 | Estructura química del ácido acético. | 8 |
| 1.7 | Estructura química de glicerol. | 9 |
| 1.8 | Estructura del catión flavilio. | 18 |
| 1.9 | Estructura de antocianidinas en frutas y vegetales. | 19 |
| 1.10 | Estructura de las betalaínas. | 20 |
| 1.11 | Estructura del timol. | 21 |
| 1.12 | Estructura del carvacrol. | 22 |
| 1.13 | Estructura química de trans-resveratrol y cis-resveratrol. | 23 |
| 1.14 | Morfología de las bacterias. | 25 |
| 1.15 | Mesofilicos aerobios. | 26 |
| 1.16 | Coliformes. | 27 |
| 1.17 | Tipos de Hongos. | 28 |
| 1.18 | <i>Penicillium notatum</i> . | 29 |
| 1.19 | <i>Aspergillus fumigatus</i> . | 30 |
| 1.20 | <i>Aspergillus niger</i> . | 31 |
| 2.1 | Puntos de medición de espesor. | 47 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.2 | Procedimiento para medir pH en muestras sólidas. | 48 |
| 3.1 | Aspecto de la película de quitosano-almidón QS2, a) día 1 y b) día 15. | 56 |
| 3.2 | Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de arándano rojo, 1: día 1 a) QSA0.5, b) QSA2 y c) QSA5; 2: día 15 a) QSA0.5, b) QSA2 y c) QSA5. | 57 |
| 3.3 | Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de arándano morado, 1: día 1 a) QSAm0.5, b) QSAm2 y c) QSAm5; 2: día 15 a) QSAm0.5, b) QSAm2 y c) QSAm5. | 57 |
| 3.4 | Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de betabel, 1: día 1 a) QSB0.5, b) QSB2 y c) QSB5; 2: día 15 a) QSB0.5, b) QSB2 y c) QSB5. | 58 |
| 3.5 | Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de granada, 1: día 1 a) QSG0.5, b) QSG2 y c) QSG5; 2: día 15 a) QSG0.5, b) QSG2 y c) QSG5. | 58 |
| 3.6 | Aspecto de las películas de quitosano-almidón con extracto acuoso de orégano, 1: día 1 a) QSO0.5, b) QSO2 y c) QSO5; 2: día 15 a) QSO0.5, b) QSO2 y c) QSO5. | 59 |
| 3.7 | Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de pitaya, 1: día 1 a) QSP0.5, b) QSP2 y c) QSP5; 2: día 15 a) QSP0.5, b) QSP2 y c) QSP5. | 59 |
| 3.8 | Aspecto de las películas de quitosano-almidón con extracto acuoso de resveratrol, 1: día 1 a) QSR0.5, b) QSR2 y c) QSR5; 2: día 15 a) QSR0.5, b) QSR2 y c) QSR5. | 60 |
| 3.9 | Aspecto de los mesofílicos aerobios. | 61 |
| 3.10 | Aspecto de colonias de bacterias coliformes. | 61 |
| 3.11 | Aspecto de colonias de <i>P. notatum</i> . | 62 |
| 3.12 | Aspecto de colonias de <i>A. fumigatus</i> . | 62 |
| 3.13 | Aspecto de colonias de <i>A. niger</i> . | 63 |
| 3.14 | Zonas de crecimiento e inhibición de microorganismos en la caja petri. | 65 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.15 | Observación de crecimiento de mesófilos aerobios en 24 y 48 horas. | 67 |
| 3.16 | Observación de crecimiento de coliformes en 24 y 48 horas. | 68 |
| 3.17 | Observación de crecimiento de hongos en 24 y 120 horas. | 69 |
| 3.18 | Efecto de concentración del extracto, del tipo de antioxidante y del día de medición sobre los valores de pH de las películas. Cada punto de datos representa la media \pm DE; * ANOVA, prueba de Tukey, $p < 0,05$. | 80 |
| 3.19 | Espectro de FTIR comparativo de QS2 vs. Películas con 0.5% de extracto en peso. | 86 |
| 3.20 | Espectro de FTIR comparativo de QS2 vs. Películas con 2% de extracto en peso. | 86 |
| 3.21 | Espectro de FTIR comparativo de QS2 vs. Películas con 5% de extracto en peso. | 87 |
| 3.22 | Espectro UV de películas con arándano rojo, arándano morado, betabel y granada. | 88 |
| 3.23 | Espectro UV de películas con orégano, pitaya y resveratrol. | 88 |
| 3.24 | Curva de calibración de ácido gálico. | 90 |
| 3.25 | Espectro Raman de QSA2, QSA5, QSG2 y QSG5 vs QS2. | 92 |
| 3.26 | Espectro Raman de QSO2, QSR2 y QSR5 vs QS2. | 93 |
| 3.27 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón QS2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 94 |
| 3.28 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con arándano rojo QSA0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 95 |
| 3.29 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con arándano rojo QSA5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 96 |

| | | |
|------|---|-----|
| 3.30 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con arándano morado QSA _m 5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 97 |
| 3.31 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con betabel QSB0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 98 |
| 3.32 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con betabel QSB2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 99 |
| 3.33 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con betabel QSB5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 100 |
| 3.34 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con granada QSG2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 101 |
| 3.35 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con granada QSG5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 102 |
| 3.36 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con orégano QSO5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 103 |
| 3.37 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con pitaya QSP0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 104 |
| 3.38 | Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con resveratrol QSR5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x. | 105 |
| 3.39 | Termograma DMA de muestras QS2, QSA0.5, QSA2, QSA5, QSA _m 5 y QSG5, Módulo de almacenamiento (E') vs. Temperatura. | 108 |
| 3.40 | Termograma DMA de muestras QS2, QSO5, QSP0.5, QSP5 y QR5, Módulo de almacenamiento (E') vs. Temperatura. | 109 |

| | | |
|------|---|-----|
| 3.41 | Temperatura de transición vítrea (Tg) comparativo QS2 vs. QSA0.5, QSA2, QSA5, QSAm5 y QSG5. | 111 |
| 3.42 | Temperatura de transición vítrea (Tg) comparativo QS2 vs. QSO5, QSP0.5, QSP5 y QSR5. | 111 |
| 3.43 | Termogramas de QSAm2, QSAm5, QSB2, QSB5 y QSO5. | 113 |

Índice de Tablas

| Tabla | Descripción | Página |
|--------------|---|---------------|
| 1.1 | Características de algunos almidones usados en la industria alimentaria. | 7 |
| 1.2 | Composición del arándano rojo por cada 100 gramos. | 11 |
| 1.3 | Composición del arándano morado por cada 100 gramos. | 11 |
| 1.4 | Composición del betabel por cada 100 gramos. | 12 |
| 1.5 | Composición de la granada por cada 100 gramos. | 13 |
| 1.6 | Composición del orégano seco por cada 100 gramos. | 15 |
| 1.7 | Composición nutricional de la pitaya roja por cada 100 g. | 16 |
| 3.1 | Nomenclatura de las películas. | 55 |
| 3.2 | Resultados de pruebas de contaminación previa | 64 |
| 3.3 | Resultados de Pruebas Antimicrobianas. | 69 |
| 3.4 | Espesor promedio de las películas. | 74 |
| 3.5 | Densidad aparente de las películas | 75 |
| 3.6 | Valores de pH de los componentes de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales. | 76 |
| 3.7 | Valores de pH de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales después de su síntesis (día 1). | 76 |
| 3.8 | Valores de pH de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales listas para su uso (día 15). | 78 |
| 3.9 | Interpretación de ANOVA multifactorial. | 81 |
| 3.10 | Valores de %Transmitancia a 280 nm y 400 nm, transparencia y opacidad de las películas. | 82 |
| 3.11 | Bandas características de absorción FTIR de las películas. | 85 |

| | | |
|------|---|-----|
| 3.12 | Longitudes de onda de bandas características de antioxidantes en películas. | 89 |
| 3.13 | Concentraciones de antioxidantes presentes en cada película en mg equivalentes a mg de ácido gálico. | 91 |
| 3.14 | Valores de módulo de almacenamiento (E') de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales y QS2. | 108 |
| 3.15 | Valores de T_g y $\tan \delta$ de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales y QS2. | 110 |

Introducción

Durante las últimas décadas, la salud humana se ha visto seriamente amenazada por la contaminación microbiológica, esto puede observarse en la propagación de infecciones alimentarias y las enfermedades transmisibles ocurridas en fechas recientes. Por lo tanto, es necesario buscar, desarrollar y mejorar el material antimicrobiano de origen natural capaz de eliminar diversos microorganismos. Investigaciones recientes han mostrado que el quitosano y diversos antioxidantes naturales son materiales biocidas naturales y son candidatos prometedores en la solución de este problema.

El quitosano se obtiene por la N-deacetilación de la quitina, el segundo polisacárido natural más abundante en la naturaleza. Debido a su buena biocompatibilidad, se aplica ampliamente en el campo de la industria farmacéutica, la agricultura, las industrias de alimentos (nutrición y biomédicas), además de contar con aplicaciones adicionales, por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales. En los últimos años, las actividades bactericidas y fungicidas del quitosano han recibido amplia atención [1]. El quitosano no es soluble en agua pura o disolventes orgánicos, pero es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos o minerales bajo condiciones específicas. Debido a su propiedad única de aumentar de la viscosidad tras la hidratación, los materiales a base de quitosano se pueden utilizar como películas o recubrimientos comestibles y degradables [2].

El almidón se ha utilizado para producir películas biodegradables, sustituyendo parcial o totalmente los polímeros plásticos debido a que son recursos renovables de bajo costo. Sin embargo, la amplia aplicación de la película de almidón está limitada por la solubilidad en agua y la fragilidad del material. No obstante la fragilidad de este material, su presencia da una mayor plasticidad a polímeros más rígidos como el quitosano, lo cual permite a través de mezclas con otros polímeros naturales diversificar sus propiedades, conservando su naturaleza biodegradable [3].

Por otro lado, existen diversas sustancias antioxidantes que se encuentran de forma natural en los alimentos, que frenan las reacciones de oxidación en las células a partir de las cuales se originan los nocivos radicales libres. Por tanto, su papel es clave en la reducción de enfermedades cardiovasculares, de tumores y enfermedades neurodegenerativas.

También actúan potenciando el sistema inmunológico. Estas sustancias han sido objeto de estudio en años recientes debido a sus propiedades biocidas y antisépticas, así como por su abundancia en la naturaleza [4].

De esta manera y con el propósito de obtener polímeros con mejores propiedades antimicrobianas y propiedades mecánicas adecuadas para su manejo a través de la adición de antioxidantes, en el desarrollo de este proyecto se sintetizaron películas de quitosano y almidón agregando extractos acuosos (arándano rojo, arándano morado, betabel, granada, orégano y pitaya) que contienen antioxidantes de origen natural tales como las antocianinas, betalaínas, timol, carvacrol y resveratrol conocidos por sus excelentes propiedades antimicrobianas.

Las propiedades biocidas de las películas de quitosano-almidón sintetizadas con los diferentes tipos de extracto natural conteniendo los antioxidantes naturales fueron analizadas mediante el cultivo de bacterias mesofílicas, bacterias coliformes y hongos.

Las características químico-estructurales fueron evaluadas mediante Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis) y Espectroscopía Raman, las propiedades morfológicas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), las propiedades ópticas mediante Espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis), las propiedades mecánicas mediante Análisis Dinámico Mecánico (DMA) y las propiedades térmicas mediante Análisis Termogravimétrico (TGA).

El presente trabajo contempla en el capítulo 1 el marco teórico referente a las características de los materiales presentes en las películas, los tipos y características de los microorganismos utilizados durante las pruebas antimicrobianas. En el capítulo 2 se muestra la metodología desarrollada durante la síntesis y caracterización de las películas. En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos en las pruebas antimicrobianas y cada una de las caracterizaciones, así como la discusión de estos resultados. En el capítulo 4 se exponen las conclusiones obtenidas en esta investigación donde se indica que la adición de extractos naturales mejora las propiedades antimicrobianas, ópticas, mecánicas y térmicas de las películas de quitosano-almidón, haciendo de ellas candidatas prometedoras en la aplicación de embalaje de alimentos.

Capítulo 1 Marco Teórico

A continuación se describen los aspectos teóricos más importantes de los componentes de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales, así como aquellos referentes a los microorganismos analizados y las técnicas de caracterización utilizadas en este proyecto.

1.1 Quitosano

El quitosano (figura 1.1) es un derivado deacetilado de la quitina, es un polímero natural compuesto de unidades de β -(1,4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa y β -(1,4)-amino-2-deoxi-D-glucosa. La carga positiva del quitosano confiere a este polímero propiedades biológicas y fisiológicas con un gran potencial en un amplio rango de industrias tales como farmacología, medicina y agricultura. La actividad antimicrobiana del quitosano ha sido considerada en una amplia variedad de microorganismos [5].

El quitosano, un copolímero de poliamina lineal de β -(1-4)-D-glucosamina y acetil- β -(1-4)-D-glucosamina, se obtiene por N-deacetilación alcalina de la quitina, el segundo polisacárido más abundante en la tierra. El quitosano es comercialmente obtenido a partir de fuentes abundantes, renovables, principalmente de residuos de la industria de los mariscos. El quitosano no es soluble en agua pura o disolventes orgánicos, pero es soluble en soluciones acuosas de ácidos minerales y ácidos orgánicos bajo condiciones específicas.

La mayor parte de las aplicaciones del quitosano se basan en la naturaleza polielectrolítica y la capacidad quelante de los grupos amino de la macromolécula. En una solución ácida, los grupos amino de quitosano están protonados a $-\text{NH}^3+$, y por lo tanto las propiedades polielectrolíticas y quelantes de quitosano son debidas principalmente a la acidez del $-\text{NH}^3+$.

El quitosano forma soluciones viscosas en diversos ácidos orgánicos. Estas soluciones viscosas se han utilizado para hacer películas funcionales. Las películas de quitosano tienen una baja permeabilidad para O_2 y CO_2 [6].

El quitosano es un polímero de carbohidrato natural modificado preparado por la N-deacetilación parcial de la quitina, un biopolímero natural derivado del caparazón de crustáceos como cangrejos, camarones y langostas. Se encuentra en algunos microorganismos, levaduras y hongos. La unidad primaria en la quitina es 2-desoxi-2-(acetilamino)-glucosa. Estas unidades combinadas por beta-(1,4) enlaces glicosídicos, forman un polímero lineal de cadena larga. Aunque la quitina es insoluble en la mayoría de los disolventes, el quitosano es soluble en la mayoría de soluciones ácidas orgánicas a pH inferior a 6.5 incluyendo ácido fórmico, ácido acético, ácido tartárico, y ácido cítrico. Es insoluble en ácido fosfórico y sulfúrico.

El quitosano está disponible en una amplia gama de peso molecular y grado de deacetilación. El peso molecular y el grado de deacetilación son los principales factores que afectan al tamaño de partícula, así como la formación y agregación de partículas. En este proyecto se utilizará quitosano de peso molecular medio y 85% deacetilado [7].

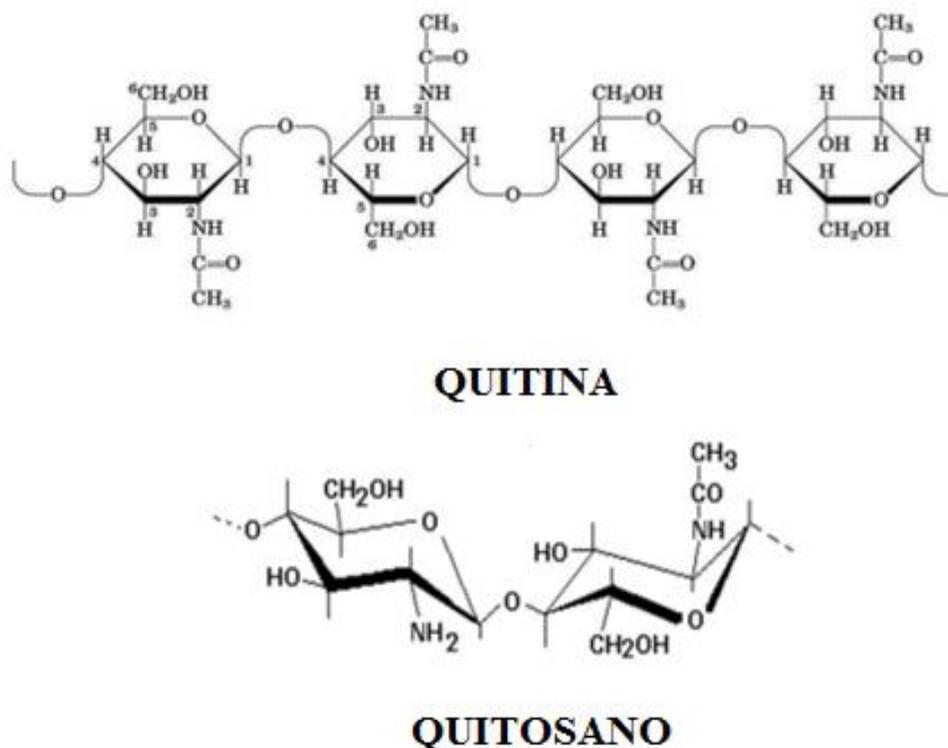


Figura 1.1 Estructura química de quitina y quitosano [A₁].

1.2 Almidón

El quitosano es un material muy rígido al formar películas, por lo que tiende a modificarse con otros polímeros que le puedan generar plasticidad. Uno de los más usados es el almidón.

El almidón (figura 1.2) consiste de dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina. La amilosa (figura 1.3) es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha(1-4)$, en el cual algunos enlaces $\alpha(1-6)$ pueden estar presentes. Esta molécula no es soluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal que es capaz de desarrollar un color azul por la formación de un complejo con el yodo. Mientras que la amilopectina (figura 1.4) es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces $\alpha(1-4)$ y en un 4-6% con uniones $\alpha(1-6)$. Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente cada 15-25 unidades de glucosa. La amilopectina es parcialmente soluble en agua caliente y en presencia de yodo produce un color rojizo violeta. Los gránulos de almidón se encuentran en un sistema polimérico semicristalino, donde la cristalinidad varía de 15 a 45%, y es atribuida a las cadenas cortas lineales de la amilopectina, que forman dobles hélices organizadas en una estructura cristalina tridimensional [8].

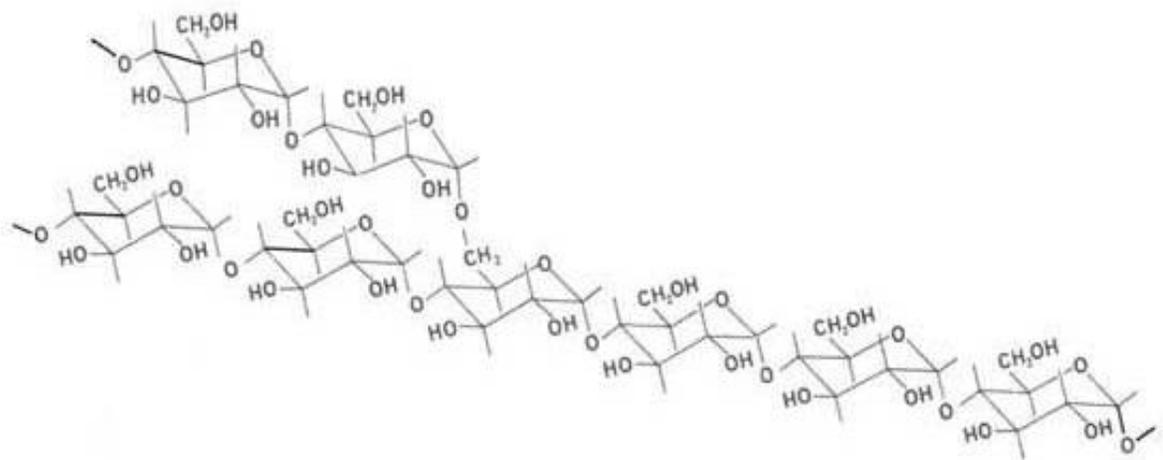


Figura 1.2 Estructura química del almidón [A₂].

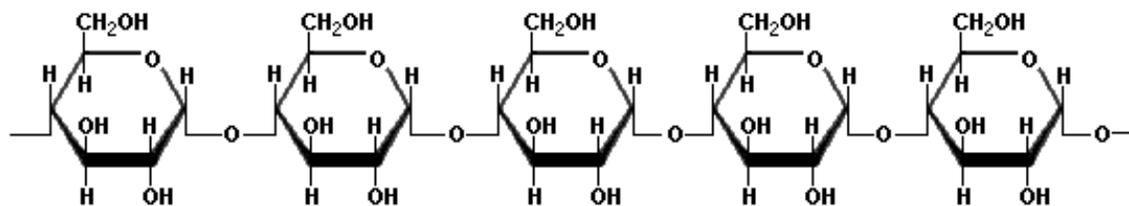


Figura 1.3 Estructura química de la amilosa [A₃].

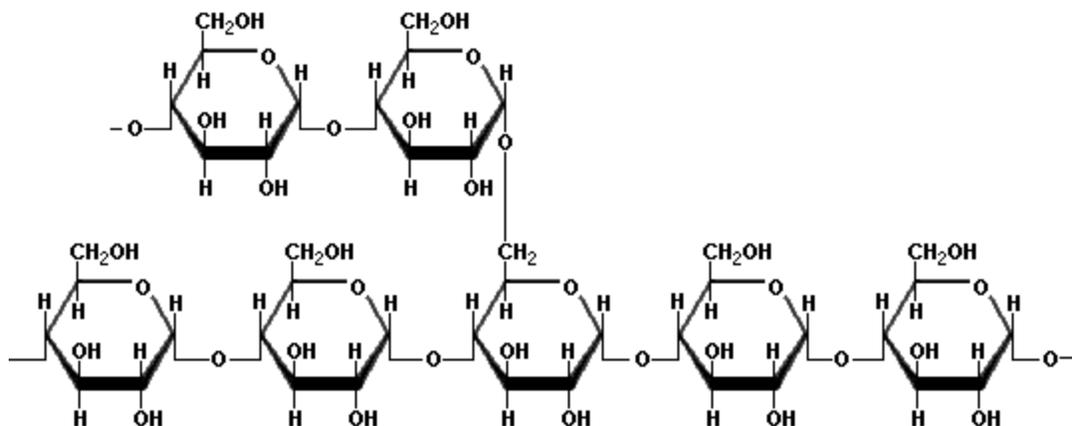


Figura 1.4 Estructura química de la amilopectina [A₄].

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría debido a que su estructura está altamente organizada y a que presenta una gran estabilidad debido a las múltiples interacciones que existen con sus dos polisacáridos constituyentes; sin embargo cuando se calientan empieza un proceso lento de absorción de agua en las zonas intermicelares amorfas que son las menos ordenadas y las más accesibles, ya que los puentes de hidrógeno no son tan numerosos ni rígidos como en las áreas cristalinas. A medida que se incrementa la temperatura, se retiene más agua y el gránulo empieza a hincharse y a aumentar de volumen; una vez que la parte amorfa se ha hidratado completamente, la cristalina inicia un proceso semejante, pero que requiere más energía.

Al llegar a cierta temperatura, el gránulo alcanza su volumen máximo y pierde tanto su patrón de difracción de rayos X como la propiedad de birrefringencia; si se administra más calor, el gránulo hinchado, incapacitado para retener el líquido, se rompe parcialmente y la amilosa y la amilopectina, fuertemente hidratadas, se dispersan en la solución. A todo

este proceso se le llama gelatinización (figura 1.5) y es una transición de un estado ordenado (estructura cristalina) a otro desordenado en el que se absorbe calor. Es decir, la gelatinización transforma los gránulos de almidón insolubles en una solución de las moléculas constituyentes en forma individual.

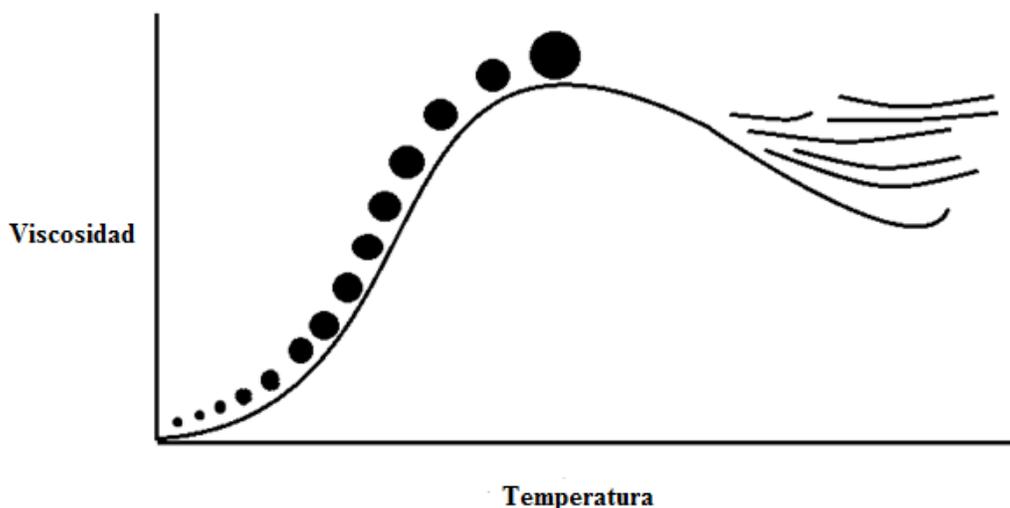


Figura 1.5 Gelatinización del almidón [9].

Se da el nombre de temperatura de gelatinización a aquella en la cual se alcanza el máximo de viscosidad y se pierden la birrefringencia y el patrón de difracción de rayos X; esta temperatura es en realidad un intervalo ya que los gránulos, aunque provengan de la misma fuente botánica, tienen diferente composición y grado de cristalinidad, lo que provoca que unos sean más resistentes que otros. Por esta razón, se llega a presentar una diferencia de hasta 10 °C entre la temperatura de gelatinización de los primeros gránulos y la de los últimos. Este parámetro también se ve afectado fuertemente por la presencia de diversos compuestos químicos que favorecen o inhiben los puentes de hidrógeno. En la tabla 1.1 se presentan las características de algunos almidones [9].

Tabla 1.1 Características de algunos almidones usados en la industria alimentaria [9].

| Tipo | Amilopectina (%) | Amilosa (%) | Temperatura de gelatinización (°C) | Tamaño del gránulo (micras) |
|----------------------|------------------|-------------|------------------------------------|-----------------------------|
| Maíz | 73 | 27 | 62-72 | 5-25 |
| Maíz rico en amilosa | 20-45 | 55-80 | 67-80 | 5-25 |

1.4 Glicerol

El glicerol es un polihidroxi alcohol ampliamente utilizado en las industrias química, farmacéutica y cosmética en virtud de sus propiedades humectantes, antisépticas, higroscópicas y espesantes (figura 1.7).

Se trata de un líquido incoloro, viscoso y casi inodoro, que posee una temperatura de ebullición de 290 °C y una temperatura de fusión de 17.9 °C. La fuerza de tensión superficial es menor que la del agua, pero mayor que la de muchos disolventes orgánicos; resulta soluble en agua y alcohol e insoluble en éter y cloroformo. El glicerol puede ser obtenido de lípidos complejos, por síntesis orgánicas, mediante la fermentación de los carbohidratos o a partir de derivados sintéticos resultantes de la refinación del petróleo [11].

Desde los últimos años de la década de los 40 y debido al descubrimiento de los surfactantes sintéticos, el glicerol ha sido producido a partir de epíclorohidrina obtenida del propileno (y éste a su vez de combustible fósil) [12]. Se agrega una pequeña cantidad de glicerol a las películas con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera y mecánicas. El glicerol actúa como plastificante para incrementar la flexibilidad del producto [13].

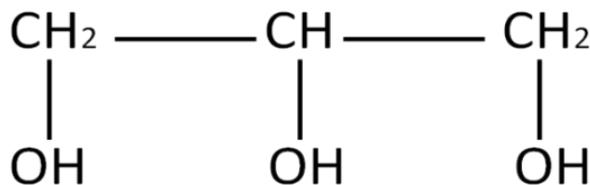


Figura 1.7 Estructura química del glicerol [A₆].

1.5 Arándano rojo

El arándano rojo, también denominado arándano rojo americano, es el fruto de la especie *Vaccinium macrocarpon* Aiton perteneciente al género *Vaccinium* L. y de la familia *Ericaceae*.

Los frutos son bayas subesféricas inicialmente blancas que tornan a color rojizo rosado o carmesí brillante al madurar. Tienen un diámetro de 9 a 14 mm y de aspecto liso.

La epidermis de la baya es firme y sólida, y debido a estas propiedades el fruto puede aguantar varios meses después del cosechado sin deteriorarse. Los frutos son comestibles y presentan un sabor amargo.

Los arándanos rojos se pueden consumir en fresco, deshidratados, concentrados o en polvo. Al presentar un sabor amargo o agrio, se procesan para la elaboración de zumos, bebidas, salsas, gelatinas, mermeladas, dulces y tartas; estas preparaciones se suelen endulzar con azúcar, sirope de maíz, sacarina o fructosa para mejorar el sabor. El zumo puro de arándano rojo también es muy ácido (pH 2.5, aproximadamente) y por tanto presenta un sabor desagradable, fue debido a ello cuando en 1930 se elaboró y se introdujo en el mercado una mezcla de zumo de arándano rojo, edulcorante, agua y vitamina C. Las bayas también se emplean en la industria alimentaria y farmacéutica como colorante y como conservante, deshidratadas o en forma de polvo para formulación en cápsulas que se comercializan como suplementos alimentarios [14].

Los arándanos presentan además un amplio espectro de sustancias bioactivas como vitamina C, vitamina A, β -caroteno y compuestos fenólicos. Entre los compuestos fenólicos, los metabolitos que predominan son los flavonoides, y particularmente las antocianinas.

Las antocianinas son responsables del intenso color de las bayas y se encuentran concentradas en la piel de estos frutos, concretamente en la epidermis y subepidermis. El contenido total de antocianinas varía de 25 a 100 mg por 100 g de fruto en función de la variedad, el clima (por ejemplo noches frías tienden a promover más el desarrollo del color), y el tamaño del fruto. Estos flavonoides presentan propiedades antitumorales, antiulcerosas, antioxidantes y antiinflamatorias.

Otros compuestos bioactivos presentes en los arándanos rojos son las proantocianidinas (PAC), otro tipo de flavonoides. En el año 2000 se identificó una proantocianidina de tipo A que inhibe la adherencia a las superficies celulares del tracto urinario de una cepa uropatógena de tipo P de *Escherichia coli*. Las PAC son capaces de inhibir también la adhesión de tipo 1 (atribuida a fructosa) de cepas de *E. coli*. Esta adhesión a las células epiteliales se debe a las proteínas denominadas adhesinas que se

encuentran en las fimbrias de la bacteria que las convierte en patogénicas. Las proantocianidinas de tipo A parecen ser responsables de la acción antiséptica y antibacteriana del arándano [14].

Tabla 1.2 Composición del arándano rojo por cada 100 g [15].

| Componente | Cantidad |
|-------------------------|-----------------|
| Calorías | 30.10 |
| Hidratos de carbono (g) | 6.90 |
| Fibra (g) | 1.80 |
| Potasio (mg) | 88.00 |
| Magnesio (mg) | 0.50 |
| Provitamina A (mcg) | 12.00 |
| Vitamina C (mg) | 17.00 |
| Vitamina E (mg) | 5.00 |

1.6 Arándano morado

Esta especie (*Vaccinium myrtillus*) es originaria de Estados Unidos, país que es el mayor productor y consumidor de arándanos morados en el mundo. Los frutos son blancos al principio y a medida que van madurando cambian a un color rojizo-morado para convertirse en morado cuando están completamente maduros. Debido a su sabor se utilizan para elaborar jaleas, mermeladas, vinos, pasteles y dulces. Tiene diversos componentes nutritivos minerales tales como hierro, calcio, potasio y vitamina C. Contienen antioxidantes, básicamente antocianinas que le dan su coloración morada [16].

Tabla 1.3 Composición del arándano morado por cada 100 g [15].

| Componente | Cantidad |
|-------------------------|-----------------|
| Calorías | 30.10 |
| Hidratos de carbono (g) | 6.90 |
| Fibra (g) | 1.80 |
| Potasio (mg) | 88.00 |
| Magnesio (mg) | 0.50 |
| Provitamina A (mcg) | 12.00 |
| Vitamina C (mg) | 17.00 |
| Vitamina E (mg) | 5.00 |

1.7 Betabel

El betabel o *Beta vulgaris* es una hortaliza originaria de la zona costera del norte de África. La planta tiene una raíz gruesa carnosa, jugosa. Sus hojas son grandes, ovales, tiernas, etc. Es un alimento de moderado contenido calórico, ya que tras el agua, los hidratos de carbono son el componente más abundante, lo que hace que ésta sea una de las hortalizas más ricas en azúcares y es una buena fuente de fibra.

Contiene pigmentos llamados antocianinas, de acción antioxidante y que le dan su color característico. Los antioxidantes bloquean el efecto dañino de los radicales libres. Los antioxidantes bloquean los radicales libres que modifican el llamado mal colesterol, con lo que contribuyen a reducir el riesgo cardiovascular y cerebrovascular. Por otro lado, unos bajos niveles de antioxidantes constituyen un factor de riesgo para ciertos tipos de cáncer y de enfermedades degenerativas [17].

El jugo de betabel contiene un alto nivel de antioxidantes accesibles biológicamente y muchos otros compuestos promotores de salud, tales como potasio, magnesio, ácido fólico, hierro, zinc, niacina, biotina, vitamina B6 y fibra soluble. Adicionalmente, es conveniente consumir jugo de betabel ya que es un vegetal muy completo.

El interés específico en el jugo de betabel se ha incrementado debido a que es una fuente rica en compuestos fenólicos. El betabel contiene predominantemente unos pigmentos llamados betalaínas, una clase de derivados del ácido betalámico, los cuales están compuestos por betacianinas, betaxantinas y compuestos fenólicos diversos.

El betabel también contiene pequeñas cantidades de otros compuestos, tales como carotenoides y ácido ascórbico los cuales pueden incrementar su capacidad antioxidante total [18].

Tabla 1.4 Composición del betabel por cada 100 g [19].

| Componente | Cantidad |
|-------------------|-----------------|
| Energía (Kcal) | 30.00 |
| Agua (ml) | 88.80 |
| Proteínas (g) | 1.30 |

| | |
|----------------------------------|--------|
| Hidratos carbono (g) | 6.40 |
| Fibra (g) | 3.00 |
| Potasio (mg) | 300.00 |
| Yodo (mcg) | 40.00 |
| Sodio (mcg) | 66.00 |
| Folatos (mcg) | 90.00 |
| Vitamina B3 (mcg eq. de retinol) | 0.40 |
| Vitamina C (mg) | 5.00 |

1.8 Granada

La granada o *Punica granatum* pertenece a la familia *Punicaceae*. Es un arbusto nativo de Asia y ha sido cultivada desde tiempos remotos en toda la región mediterránea de África y partes de Europa. El fruto se consume directamente como fresca o jugo y se utiliza en la industria alimentaria en la fabricación de jaleas y jarabes (granadina).

El pericarpio de la fruta (cáscara, rico en taninos) se ha utilizado en la medicina tradicional marroquí como astringente, diurético, colorante natural, y también se recomienda para el tratamiento de la diarrea, la disentería, la úlcera gástrica, trastornos de la coagulación, inflamación de las encías, y para el tratamiento de algunas infecciones [20].

La granada es utilizada en la medicina tradicional de diferentes culturas de Asia y América. En países como India, Túnez y Guatemala se utiliza la granada como germicida, astringente y para tratamientos de aftas y malestares estomacales. En la medicina tradicional de la India se utiliza como purificador de la sangre y para curar infecciones parasitarias.

El consumo de granada aporta otros beneficios en la salud, tales como protector cardiovascular y neuronal, efecto hipoglucémico, propiedades anticancerígenas, prevención de gastritis y úlceras.

La granada contiene más de 100 fitoquímicos, una parte considerable de estos contribuye a su actividad antioxidante. Sin embargo, diversas variables como la temporada

de cosecha, el suelo, y el método de obtención pueden afectar la composición química y por ende la actividad biológica.

Los elagitaninos y las antocianinas representan los fenoles más abundantes en el jugo de granada. Los elagitaninos consisten en una clase compleja de polifenoles caracterizados por una o más fracciones hexahidroxidifenol esterificadas a azúcar, usualmente glucosa. El contenido de elagitaninos en el jugo de granada es de 1500-1900 mg/ml. Entre los elagitaninos que contiene se encuentran los punicalaginos, punicalina y ácido gálico. Los punicalaginos son únicos en la granada y poseen un peso molecular mayor a 1000.

Las antocianinas contenidas en el jugo de granada incluyen a los 3-glucósidos y los 3,5-diglucósidos de delphinidina, cianidina y pelargonidina. La cantidad de antocianinas es mayor en las frutas frescas que en las congeladas [21].

Tabla 1.5 Composición de la granada por cada 100 g [22].

| Componente | Cantidad |
|-------------------------|-----------------|
| Calorías (kcal) | 34.00 |
| Hidratos de carbono (g) | 7.50 |
| Fibra (g) | 0.20 |
| Vitamina C (mg) | 5.70 |
| Vitamina A (mcg) | 3.50 |
| Potasio (mg) | 275.00 |
| Magnesio (mg) | 3.00 |
| Calcio (mg) | 8.00 |

1.9 Orégano

El orégano es ampliamente utilizado como condimento, su sabor y olor son muy apreciados en todo el mundo para aplicaciones culinarias. Además, esta hierba tiene propiedades antimicrobianas y antioxidantes, De acuerdo con diversos estudios los principales componentes del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* son el timol (650-750 mg / ml) y el carvacrol (40-60 mg / ml). Los extractos de orégano, en algunos casos, tienen niveles más altos de actividad antioxidante que el BHT y BHA [23].

El orégano es un recurso forestal no maderable que se desarrolla en las zonas áridas y semiáridas de México. Los principales tipos de orégano de importancia económica en el mundo son: el orégano turco (*Origanum onites* L.); griego (*Origanum vulgare* ssp.); español (*Coridohymus capitatus* L.) y el orégano mexicano (*Poliomintha longiflora* Gray). En el estado de Nuevo León se reporta la presencia de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray). Se encontró que el orégano mexicano (*Poliomintha longiflora* Gray) tiene el mayor contenido de polifenoles totales y la mayor capacidad antioxidante comparado con 40 hierbas diferentes [24].

Tabla 1.6 Composición del orégano seco por cada 100 g [25].

| Componente | Cantidad |
|-------------------|-----------------|
| Calorías (kcal) | 265.00 |
| Proteínas (g) | 9.00 |
| Lípidos (g) | 4.28 |
| Carbohidratos (g) | 68.92 |
| Agua (g) | 9.93 |
| Calcio (mg) | 1597.00 |
| Potasio (mg) | 1260.00 |

1.10 Pitaya

La pitaya es una planta perenne nativa del sureste de México, el lado pacífico de Guatemala, Costa Rica y El Salvador. La temporada normal de florecimiento y producción es durante el verano, de junio a octubre. La pitaya es el fruto de una cactácea que se ha consumido en América por generaciones.

Tiene una amplia demanda en el mercado internacional y se le considera una fruta exótica de sabor característico dulce y gran contenido de agua. Crece en forma silvestre en 20 estados de la República, aunque sólo se cultiva con fines comerciales en varias regiones de Tabasco, en la Península de Yucatán y en la Mixteca poblana. El fruto es como una baya globosa o subglobosa (dehiscente en *Hylocereus* e indehiscente en *Selenicereus*), mide de 8 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de diámetro, su cáscara es de color rojo o amarillo, en variados matices, cubierta con escamas foliáceas o brácteas distribuidas helicoidalmente; es de pulpa dulce y abundante, de color blanco, amarillo o de varias tonalidades de rojo. Las

semillas son numerosas, pequeñas en *Hylocereus* y grandes en *Selenicereus*, de color café oscuro o negro, se encuentran distribuidas en toda la pulpa y contienen aceite. Las pitahayas cultivadas muestran excesiva variación, para simplificar se han clasificado en cuatro grandes grupos: pitaya amarilla, pitaya roja de pulpa roja, pitaya roja de pulpa blanca (la que se utilizó en este proyecto) y pitaya blanca.

Las pitayas rojas de pulpa blanca se cultivan en México, Vietnam, Taiwán y recientemente en Israel. Los frutos son de cáscara roja y de pulpa blanca y contienen entre 10 y 12 °Brix. Pertenecen a la especie botánica *Hylocereus undatus*. México y Vietnam comenzaron a colocarla en el mercado internacional, al que recientemente se incorporó Israel. Su peso promedio es de 370 g, fructifica de junio a octubre y en general muestra mucha variación en cuanto a forma, tamaño, color y sabor del fruto. Algunos usos del fruto son: ornamental, consumo humano (en ayunas de la pulpa es eficaz para el tratamiento de la gastritis y también contribuye al buen funcionamiento del sistema digestivo, pues evita los cólicos y los retortijones; en jarabes, jugos, licores, salsas y liofilizados), medicina (para tratar diversas enfermedades y problemas de belleza), consumo animal (forrajes) e industrial (colorantes). Los frutos de la pitaya son no climatéricos (no son objeto de una maduración dramática, tal como ocurre con los plátanos), y son sensibles al daño por frío. Las frutas pueden ser cosechadas 30 días, pero es mejor esperar 50 días, para permitir el desarrollo de una mayor dulzura en la fruta. La fruta sigue creciendo hasta que es cosechada, sin cambio apreciable en el contenido de azúcar [26-27].

Tabla 1.7 Composición nutricional de la pitaya roja por cada 100 g [28].

| Componente | Cantidad |
|----------------------|-----------------|
| Ácido ascórbico (mg) | 25.00 |
| Agua (g) | 84.40 |
| Calcio (mg) | 6.00 |
| Calorías (kcal) | 54.00 |
| Carbohidratos (g) | 13.20 |
| Fibra (g) | 0.50 |
| Fósforo (mg) | 26.00 |
| Proteína (g) | 1.40 |
| Hierro (mg) | 1.30 |

1.11 Antioxidantes naturales

Los antioxidantes son sustancias que retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles a las especies reactivas del oxígeno ya que donan sus hidrógenos a estas de manera que protegen las células contra el daño de los radicales libres.

Los organismos que viven en condiciones aeróbicas tienen desarrollados varios sistemas de defensa antioxidante para hacer frente a entidades derivadas con el oxígeno potencialmente dañinos, colectivamente conocidas como especies reactivas del oxígeno (ROS). Si la generación de especies reactivas es alta y supera la eficacia de la defensa antioxidante del sistema, surge una condición llamada estrés oxidativo, la protección contra el estrés oxidativo endógeno es alcanzado por las enzimas catalíticas que eliminan radicales libres y otras especies reactivas, estos incluyen superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, pero debido a las exigencias que tiene el cuerpo humano el sistema de defensa resulta insuficiente, por lo que es necesario el consumo de compuestos antioxidantes por medio de la alimentación [29].

En los últimos años, los antioxidantes naturales provenientes de plantas han sido frecuentemente usados en diferentes campos de la industria como preservantes en alimentos y en medicinas, muchos de estos compuestos presentan una actividad comparable con antioxidantes sintéticos de mayor uso como el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) y el 2-terbutil-hidroxianisol (BHA); los cuales, pese a sus propiedades antioxidantes presentan la desventaja de ser tóxicos.

Los antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos pero también existe una clasificación de acuerdo las estructuras químicas de estos, sobresaliendo los polifenoles y dentro de estos los flavonoides y taninos.

Los polifenoles poseen los siguientes efectos: actividad antioxidante así como su acción in vivo e in vitro teniendo como resultado que estos poseen actividad antiinflamatoria, antioxidativa, quimioprotectora, neuroprotectora, reguladora de la glucosa, etc. [29].

En este proyecto se utilizaron algunos antioxidantes: antocianinas (arándano rojo, arándano morado y granada), betalainas (betabel y pitaya), timol (orégano), carvacrol (orégano) y resveratrol (uva) debido a sus propiedades biocidas y antisépticas, y naturaleza hidrosoluble, así como por su abundancia en la naturaleza.

1.11.1 Antocianinas

Son pigmentos hidrosolubles ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con características de glicósidos; están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se une un azúcar por medio de un enlace β -glicosídico, y en algunos casos por un enlace α -glicosídico. La estructura química fundamental de estas agliconas es el ión flavilio (figura 1.8).

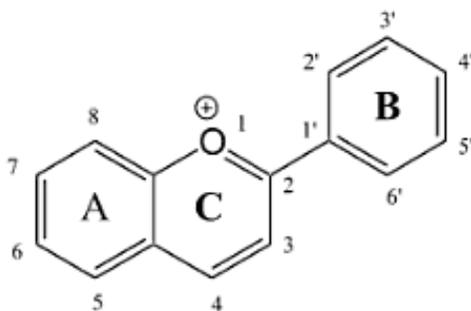


Figura 1.8 Estructura química del catión flavilio [30].

El catión flavilio consta de dos grupos aromáticos: un sistema heteroanular fusionado tipo benzopirilio formados por los anillos A y C, y un anillo B de naturaleza fenólica. Por el carácter trivalente del oxígeno, el flavilio normalmente se comporta como un catión. Los hidratos de carbón que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, la xilosa, la arabinosa y ocasionalmente la gentiobiosa, la rafinosa y la soforosa: todos ellos se unen a la antocianidina principalmente por medio del hidroxilo de la posición 3 y en segundo término, de la 5 o de la 7. Cuando en una misma molécula se encuentran dos azúcares, estos se localizan en los hidroxilos 3 y 5, produciendo una estructura generalmente más estable que cuando contiene un solo monosacárido.

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son: pelagordina, delphinidina, cianidina, peonidina, petunidina y la malvadina (figura 1.9). Estos nombres se derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez. La combinación de éstas con los diferentes azúcares, genera aproximadamente 150 antocianinas que abundan en la naturaleza.

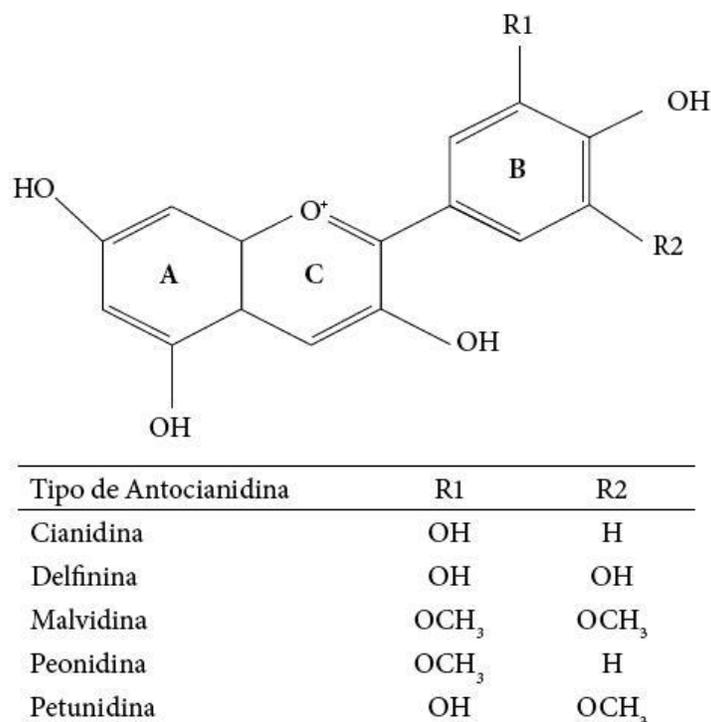


Figura 1.9 Estructura química de antocianidinas en frutas y vegetales [30].

Son responsables de los colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas, rosas, fresas y muchos productos de origen vegetal, principalmente frutas y flores.

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos (OH) del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos (CH₃O) provoca la formación de los tonos rojos.

Debido a la deficiencia electrónica (carga positiva) del núcleo de flavilio, estos pigmentos funcionan como verdaderos indicadores de pH; es decir, su color depende de las

condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran: a pH ácidos adquieren una estructura estable de catión flavilio rojo, cuando se incrementa el pH, la distribución electrónica se modifica hasta llegar a la forma quinoidal azul; la hidratación del flavilio produce la base carbinol incolora.

Los cambios fisiológicos en la maduración de los frutos llevan consigo alteraciones en el pH y por lo tanto, modificaciones en el color del tejido vegetal. Al aumentar la temperatura se acelera la decoloración de las frutas [30].

1.11.2 Betalaínas

Las betalaínas son pigmentos naturales hidrosolubles con nitrógeno en su estructura que se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. Las betalaínas se dividen en dos grupos: betacianinas, que brindan tonalidades rojas y se forman por condensación de una estructura ciclo-DOPA (dihidroxifenilalanina) con el ácido betalámico, y betaxantinas que proporcionan coloraciones amarillas y se sintetizan a partir de diferentes compuestos amino y el ácido betalámico (figura 1.10).

Además de dar coloración a los frutos que las contienen y poseer actividad antioxidante, las betalaínas son reconocidas por otras importantes actividades biológicas, tales como la inducción de la quinona reductasa, potente enzima de detoxificación en la quimio prevención del cáncer, y su actividad antiproliferativa de células de melanoma maligno [31].

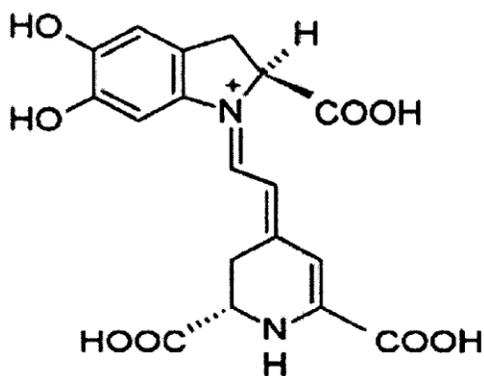


Figura 1.10 Estructura química de las betalaínas [31].

1.11.3 Timol

El timol o 2-isopropil-5-metilfenol es una sustancia cristalina incolora con un olor característico que está presente en la naturaleza en los aceites esenciales del tomillo o del orégano. El timol pertenece al grupo de los terpenos y un isómero del timol es el carvacrol. El timol se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida. Por su sabor agradable está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes etc. Una disolución de 5% timol en etanol se utiliza para la desinfección dermal y contra infecciones con hongos. En veterinaria se aplica igualmente contra infecciones dermales y para estimular la digestión (figura1.11) [32].

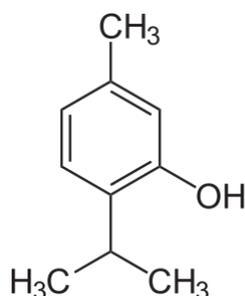


Figura 1.11 Estructura química del timol [A7].

1.11.4 Carvacrol

El carvacrol (figura 1.12) es un compuesto químico que se encuentra en los aceites esenciales de la mejorana, el orégano, el tomillo y otras plantas. Es un líquido incoloro, levemente soluble en agua y soluble en etanol y éter. Se utiliza como conservador de alimentos, en la industria cosmética, en desinfectantes y en la medicina alternativa, debido a sus propiedades antibacterianas, antimicóticas, analgésicas y antioxidantes. El carvacrol se utiliza en desinfectantes naturales y biodegradables, frecuentemente combinado con otros compuestos naturales, como el tomillo, el ciclamen, el aceite de eucalipto y el eugenol. La actividad antimicrobiana del carvacrol se observó en concentraciones tan bajas como el 0.07 por ciento.

El carvacrol se emplea como conservante de alimentos, debido a su actividad antimicrobiana, así también como por su sabor y aroma sutiles. El agregado de carvacrol a los alimentos puede inhibir el crecimiento y reducir la cantidad de patógenos. El carvacrol también puede aplicarse a los alimentos en forma de vapor para extender su vida útil y mejorar la seguridad de la comida al destruir bacterias como la *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*.

El compuesto natural también puede sintetizarse en el laboratorio. En aromaterapia (una forma de medicina alternativa que utiliza aceites esenciales como tratamiento para la salud) se utilizan el aceite de orégano y otros extractos ricos en carvacrol por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y bactericidas. El carvacrol que contiene el aceite esencial de orégano se usa en la industria cosmética como una fragancia, así como también como un componente de jabones, cremas y perfumes. La sustancia no es irritante para la piel humana y segura cuando se la usa con una concentración máxima de 0.5 por ciento en cosmética y productos de cuidado personal [33].

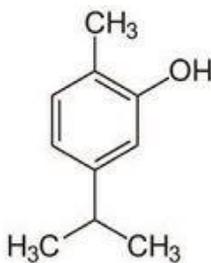


Figura 1.12 Estructura del carvacrol [A₈].

1.11.5 Resveratrol

El resveratrol o 3,5,4-trihidroxiestilbeno es un polifenol natural, con estructura de estilbeno. Su estructura química no fue caracterizada hasta 1940 por Takaoka, quien logró aislarlo de las raíces de *Veratrum grandiflorum*.

El resveratrol es un antioxidante producido por más de 70 especies de plantas en respuesta a situaciones estresantes (radiación ultravioleta, infecciones fúngicas, etc.). Está presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana tales como los arándanos

(*Vaccinium spp.*), la grosella (*Vaccinium spp.*), las moras (*Morus spp.*) y los cacahuets (*Arachis hypogaea*). Otro alimento rico en resveratrol es el vino tinto. La presencia de resveratrol está documentada también en algunos árboles como el eucalipto y el abeto. Así pues, el resveratrol se encuentra en una gran cantidad de plantas, de las cuales puede ser extraído.

El resveratrol pertenece al llamado grupo de las fitoalexinas. Estas sustancias químicas se caracterizan por tener bajo peso molecular y ser capaces de inhibir el progreso de ciertas infecciones. La acumulación de estas sustancias en las plantas se produce como consecuencia de un mecanismo de resistencia a los parásitos y otras condiciones adversas.

En los alimentos naturales, plantas o el vino coexisten los isómeros *cis*- y *trans*- (figura 1.13), sin embargo, la forma natural mayoritaria y más estable parece ser el isómero *trans*-. La *cis*-isomerización puede ocurrir cuando la isoforma *trans*- es expuesta a la luz solar o artificial o radiación ultravioleta.

Tiene efectos favorables sobre el sistema cardiovascular, como el de la regulación del acúmulo de triglicéridos y la lipólisis, agregación plaquetaria, etc. Es anticancerígeno, antiinflamatorio, antialérgico, neuroprotector, promueve la osteogénesis, tiene beneficios sobre la fragilidad, etc. Sin embargo, la biodisponibilidad parece limitar estos efectos [34].

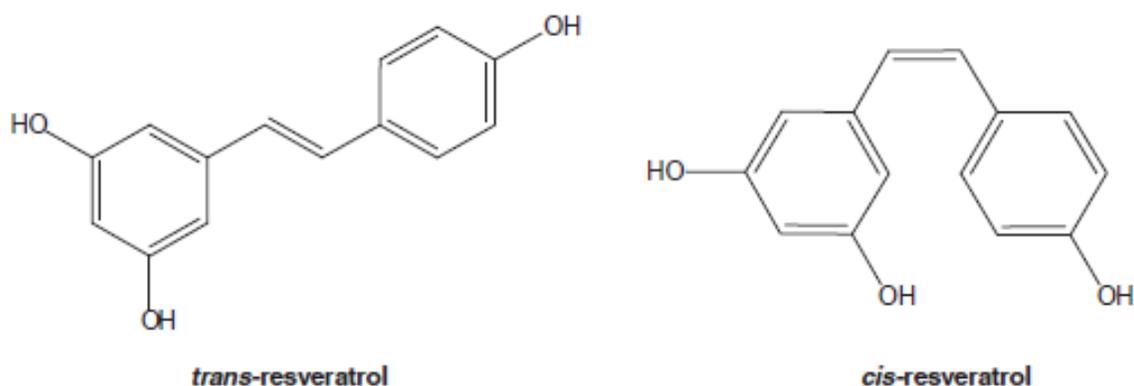


Figura 1.13 Estructura química de *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol [34].

1.12 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares muy pequeños y relativamente sencillos, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, por ello se llaman procariotas.

Estructuralmente están constituidos por:

- Elementos obligados: Están presentes en todas las bacterias y son indispensables para la vida de la propia bacteria. Son la pared celular, la membrana plasmática, citoplasma, ribosomas y la región nuclear.
- Elementos facultativos: Pueden estar o no presentes en la bacteria y son, cápsula, flagelos, pelos, endósporas e inclusiones citoplásmicas.

Las bacterias se han clasificado durante mucho tiempo como bacterias Grampositivas y Gramnegativas, en función de su comportamiento frente a la tinción de Gram. El hecho de que se comporten como Grampositivos (se tiñen de color azul-violeta) o como Gramnegativos (se tiñen de color rojo-rosa) se debe a su pared celular.

Las bacterias son de pequeño tamaño, por lo que para su observación es preciso utilizar el microscopio óptico. Su tamaño se mide en μm y oscila entre 0.2 y 2 μm .

Las formas básicas son esférica (coco), bastoncillo o cilíndrica (bacilo), helicoidal (espirilo), en forma de coma (vibrio), espiral (espiroqueta), bacilo fusiforme y cocobacilo (figura 1.14).

Pueden ser mesofílicos (crecen entre 20-40 °C, una óptima de 37 °C), psicrófilos (menos de 20 °C) y termófilos (mayor de 40 °C). Pueden ser de crecimiento rápido o lento. Son de naturaleza aerobia, anaerobia o microaerófila [35].

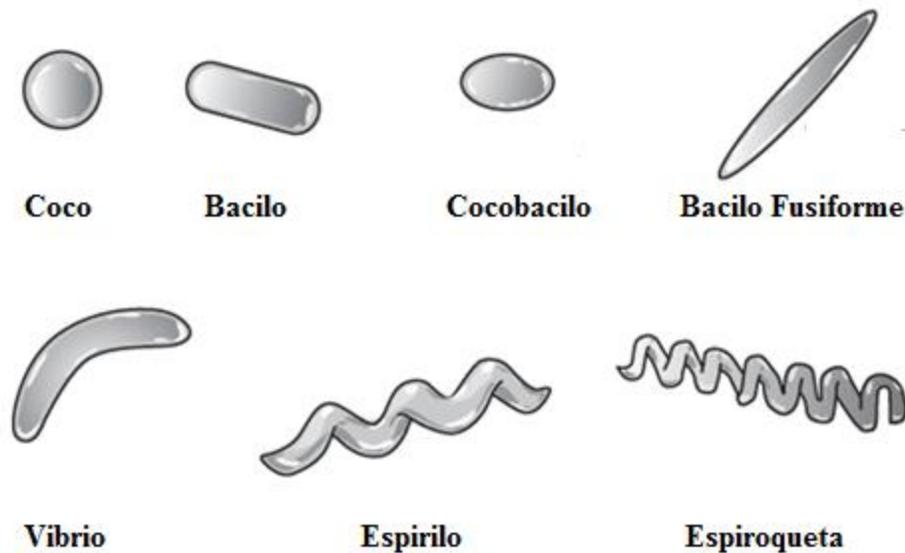


Figura 1.14 Morfología de las bacterias [A₉].

1.12.1 Mesofílicos aerobios

Muchas de las bacterias más estudiadas son mesofílicas (figura 1.15), y pertenecen a dos subdivisiones bastante precisas: 1) las bacterias cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20° - 35 °C, y 2) aquellas cuyas temperaturas óptimas se encuentran entre 35° y 45 °C. El primer grupo incluye principalmente los saprofitos y parásitos vegetales, en tanto que el último son principalmente parásitos animales o comensales (microorganismos que viven en un huésped pero no le causan daño). Las temperaturas mínima y máxima de crecimiento varían correspondientemente, pero la mayor parte de ellas se localizan en los límites de 10° a 52 °C. Como su nombre lo indica, estas bacterias crecen en presencia de aire [36].

Su estudio en alimentos es importante, aunque no sean patógenos, ya que se les considera organismos indicadores debido a que los recuentos altos de gérmenes viables señalan frecuentemente materias primas contaminadas, limpieza y desinfección no correctas.

Su presencia en alimentos también indica que se han dado las condiciones que podrían favorecer el crecimiento de ciertos organismos patógenos, los cuales también estarían presentes en gran número.

Algunos microorganismos relacionados con la presencia de los mesofílicos aerobios son: *Clostridium botulinum* (produce una toxina muy peligrosa), *Cl. Perfringers*, *Bacillus mesentericus*, *B. subtilis*, *Lactobacillus lycopersici*, *L. pentaceticus*, etc. Los altos recuentos indican que el alimento va a alterarse muy pronto debido a la presencia de múltiples microorganismos [37].



Figura 1.15 Mesofílicos aerobios [A₁₀].

1.12.2 Coliformes

Son las bacterias indicadoras más importantes consideradas en los análisis bacteriológicos del agua. El grupo contempla a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas: ser aerobias o anaerobias facultativas, ser bacilos Gramnegativos, no ser esporógenas.

Las bacterias coliformes (figura 1.16) se utilizan para la supervisión de la seguridad bacteriológica de los suministros de agua, la presencia de bacterias coliformes en el agua es un indicador de la potencial contaminación fecal humana y por lo tanto la posible presencia de un patógeno entérico [38].



Figura 1.16 Coliformes Totales [A₁₁].

1.13 Hongos

Los hongos están formados por células eucariotas. El DNA está organizado en cromosomas que se hallan envueltos por la membrana celular. El citoplasma, con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas, está limitado por una membrana citoplásmica rica en ergosterol. Recubriendo la membrana se encuentra una pared celular rígida de estructura polisacárida compleja compuesta mayoritariamente por quitina, mananos y glucanos. Tienen un metabolismo de tipo quimioheterótrofo absoritivo, es decir, obtienen la energía y el carbono absorbiendo los nutrientes de la materia orgánica, que descomponen mediante la producción de exoenzimas (figura 1.17). Pueden reproducirse por medio de procesos asexuales- mediante división binaria o formando esporas asexuales- o a través de esporas sexuales.

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, tabicándose de un modo más o menos completo, formando largos filamentos denominados hifas que con frecuencia se ramifican. Estos hongos, denominados mohos, al crecer forman matas de filamentos entrelazados, como puede apreciarse en el pan o las frutas enmohecidas.

Los hongos filamentosos son pluricelulares; las células son alargadas, con una anchura de 3 a 15 μm de diámetro y de longitud variable. Crecen por extensión apical, tabicándose para formar nuevas células que no se desprenden. Los filamentos celulares así constituidos se denominan hifas y van ramificándose con frecuencia hasta formar un

conjunto entrelazado de hifas que se denominan micelio. Los hongos filamentosos se pueden clasificar en superiores e inferiores [39].

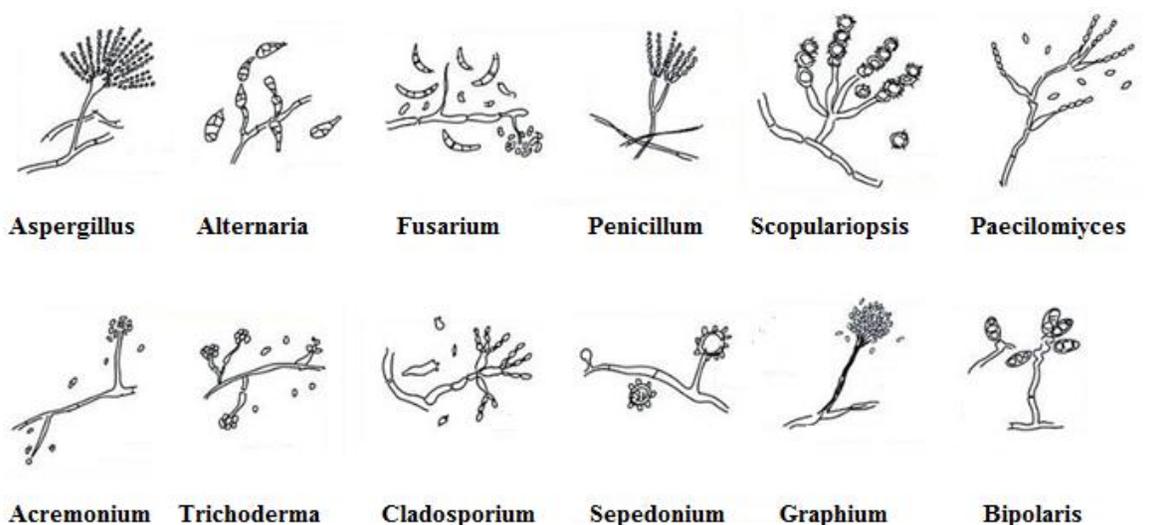


Figura 1.17 Tipos de hongos [A12].

1.13.1 *Penicillium notatum*

Las especies de *Penicillium* tienen distribución amplia y aparecen en sustancia orgánica en descomposición. Existen más de 140 especies. Raramente afecta al ser humano. Se encuentran en manzanas, peras, uvas y cítricos en almacenamiento, o en papel y en fibras textiles. Se emplean en la manufactura de quesos Camembert (*P. Camemberti*) y Roquefort (*P. Roqueforti*).

Las colonias tienen consistencia aterciopelada y color verdoso o azul verdoso y pueden tener 30 a 40 mm de diámetro en medios de laboratorio. La palabra *Penicillium* proviene del latín y significa pequeño pincel.

El hongo *Penicillium notatum* produce cepas parecidas al *Aspergillus fumigatus*, ya que son de color verde o tener variantes amarillentas. Tienen superficie granular y pliegues radiales rugosos. Presentan un desarrollo rápido, entre 3 y 7 días. Raramente ocasionan enfermedad micótica en pacientes comprometidos (figura 1.18).

De este hongo se obtiene la penicilina. Fleming la descubrió en 1929. Observó que las colonias de un estafilococo en la proximidad de un hongo contaminante en una placa de exudado faríngeo, gradualmente se disolvieron y desaparecieron. De este cultivo obtuvo una solución que eliminó a varias bacterias Grampositivas. Se identificó a este hongo como *Penicillium notatum*. Fleming continuó estudiando el nuevo antibiótico y se realizaron ensayos en seres humanos en 1941, demostrando su efectividad contra bacterias y su baja toxicidad [36].



Figura 1.18 *Penicillium Notatum* [A₁₃].

1.13.2 *Aspergillus fumigatus*

Es un hongo filamentoso (figura 1.19) con conidióforos cortos (300 x 3-8 μm) raramente ramificados, de pared lisa, incoloros o ligeramente verdosos, sin tabicar y sin ramificaciones. Colonias de crecimiento rápido, planas, vellosas, compactas, blancas al comienzo, toman rápidamente un color verde grisáceo, de aspecto aterciopelado y consistente.

La superficie muestra algunos pliegues y mechones vellosos blancos. Dorso incoloro que, al envejecer, toma tintes amarillos o pardos. Su crecimiento es más rápido a temperaturas ambientes. Es un saprobio cosmopolita que se ha aislado prácticamente de cualquier tipo de sustrato, especialmente del suelo y materiales orgánicos en descomposición. A pesar de esta amplia distribución, la concentración de esporas en la atmósfera es baja en comparación con otros alérgenos aerotransportados. *Aspergillus fumigatus* puede producir enfermedades de componente alérgico. *Aspergillus fumigatus* es también responsable de muchos casos de aspergilosis broncopulmonar alérgica y

aspergiloma, dos condiciones clínicas en las que dicho hongo actúa como colonizador bronquial y no un invasor tisular [40].

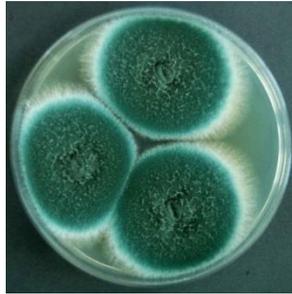


Figura 1.19 *Aspergillus fumigatus* [A₁₄].

1.13.3 *Aspergillus niger*

El hongo *Aspergillus niger* presenta un aspecto pulverulento y presenta esporas de color negro. El reverso de esta colonia presenta un color ámbar claro. Este microorganismo ha sido objeto de investigación y uso industrial desde hace varias décadas. En primer lugar, adquirió importancia práctica en 1919, cuando su capacidad de producir ácido cítrico fue explotada industrialmente. Los ácidos fumárico y glucónico también se han producido con *A. niger*, aunque son de menor importancia económica. Sin embargo, desde la década de 1960, este hongo se ha convertido en fuente de una variedad de enzimas que están bien establecidas como ayudas técnicas en el procesamiento de frutas, panadería, así como en las industrias de almidón y alimentos (figura 1.20).

Muchos *Aspergillus niger* se han aislado de todo el mundo, es un hongo filamentoso que crece aeróbicamente en materia orgánica. En la naturaleza, se encuentra en el suelo y la hojarasca, en la composta y en la descomposición de material vegetal. *A. niger* es capaz de crecer en el amplio rango de temperatura de 6-47 °C con un óptimo de temperatura relativamente alta a 35-37 ° C. El límite de actividad de agua para el crecimiento es 0.88, que es relativamente alta en comparación con otras especies de *Aspergillus*. *A. niger* es capaz de crecer en un rango de pH muy amplio: 1.4-9.8. Estas habilidades y la producción abundante de conidiosporas, que se distribuyen a través del aire, asegura la presencia ubicua de la especie, con una mayor frecuencia en lugares cálidos y húmedos. Este hongo

se convirtió en un organismo industrial usado cuando el ácido cítrico fue producido por fermentación en 1919 y es utilizado en una amplia variedad de industrias (alimentos y bebidas, detergentes, curtido de cuero, en galvanoplastia) [41].

El *A. niger* se considera generalmente como un organismo seguro. En casos raros, cuando las personas están expuestas a un intenso polvo de esporas, se han observado reacciones de hipersensibilidad. *A. niger* se considera generalmente como un hongo no patógeno ampliamente distribuido en la naturaleza. Los seres humanos están expuestos a sus esporas todos los días sin enfermedad evidente. Sólo en pocos casos ha sido capaz de colonizar el cuerpo humano como un invasor oportunista y en casi todos estos casos, los pacientes tienen antecedentes de enfermedad grave o tratamiento inmunosupresor [41].



Figura 1.20 *Aspergillus niger* [A15].

1.14 Antecedentes

A continuación se muestran los antecedentes considerados para el desarrollo de esta investigación.

Carocho y col. (2013), indicaron que hay diversos estudios con respecto a los radicales libres, el estrés oxidativo y la actividad antioxidante de los alimentos, en los cuales se ha dado a los antioxidantes un papel beneficioso. Sin embargo, también hay otros estudios que han cuestionado su importancia y al mismo tiempo han tratado de entender los mecanismos detrás del estrés oxidativo.

En este estudio defienden que, independientemente de la cantidad de antioxidantes que se ingiere, la absorción es muy limitada, y que en algunos casos los prooxidantes son beneficiosos para la salud humana.

Los radicales libres, antioxidantes y cofactores son las tres áreas principales que pueden contribuir al retraso del proceso de envejecimiento. Los radicales libres se derivan de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, creando así las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de azufre (RSS).

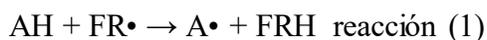
Los principales objetivos de ROS, RNS y RSS son las proteínas, moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico), azúcares y lípidos.

Estas reacciones conducen a la producción de ROS, RNS y RSS los cuales se han relacionado con muchas enfermedades graves como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, entre otras.

También se ha postulado que el equilibrio entre la oxidación y antioxidación es crítico en el mantenimiento de un sistema biológico saludable. Las dosis bajas de antioxidantes pueden ser favorables a este sistema, pero las altas cantidades pueden alterar el equilibrio. Considerando este antecedente, se decidió elegir bajas concentraciones de extractos para mantener un equilibrio que propicie el buen funcionamiento de los antioxidantes durante las pruebas antimicrobianas (ver sección 2.3, 3.2 y 3.7) [42].

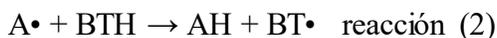
López-Alarcón y col. (2013), revisaron las metodologías basadas en la capacidad antioxidante de productos naturales, discutiendo los mecanismos clásicos y no clásicos de acción de los antioxidantes.

Los antioxidantes pueden actuar utilizando diferentes mecanismos. El más común es la creación de derivados a partir de la ruptura de cadenas, de acuerdo a la reacción (1):

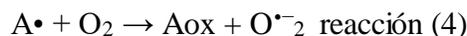


Donde AH y FR• representan un antioxidante y un radical libre, respectivamente.

Otro aspecto a considerar en el comportamiento antioxidante de una muestra es la habilidad de los radicales libres secundarios ($A\bullet$) generados en la reacción (1) para dañar objetivos biológicos.



Se ha observado que los radicales fenoxilo secundarios pueden, en algunas condiciones, desencadenar modificaciones oxidativas sobre las proteínas, ADN; así como sobre lípidos de membranas celulares. Esto, dependiendo del compuesto antioxidante y / o del lugar donde se genera $A\bullet$, puede reaccionar con O_2 para formar un radical peroxilo secundario o anión superóxido (reacción (3) y reacción (4), respectivamente). En este último caso, la dismutación del superóxido (usualmente catalizada por superóxido dismutasa) produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia de metales genera un radical hidroxilo (mecanismo Fenton), un radical libre fuertemente oxidante.



La capacidad antioxidante de un extracto de producto natural dependerá esencialmente de la biodisponibilidad de la mezcla específica que los compuestos presenten, sus interacciones sinérgicas para producir la respuesta antioxidante final a nivel celular. Es decir, es necesario considerar que la cantidad y calidad de los antioxidantes dependerá del estado de las fuentes de las que provengan así como su interacción con el medio ambiente. Esto puede observarse en los resultados mostrados en los sección 3.2 y 3.7 [43].

Abd El-Rehim y col. (2012), modificaron quitosano (CS) para obtener N-maleiquitosano (NMCS), N-ftaloquitosano (NPhCS) y quitosano sulfonado (SCS) utilizando anhídrido maleico, anhídrido ftálico y ácido clorosulfónico, respectivamente, seguido de la exposición a los rayos gamma en diferentes dosis.

Los resultados mostraron que los derivados de quitosano con diferentes pesos moleculares exhiben actividad antioxidante. Cuanto menor sea el peso molecular del quitosano y sus derivados, más alta es la actividad antioxidante.

El NMCS poseía alto efecto de barrido sobre los radicales DPPH en comparación con NPhCS, SCS y ácido ascórbico. El quitosano irradiado y sus derivados podrían ser utilizados como antioxidantes naturales.

Esto significa que el tratamiento del quitosano por radiación mejora su habilidad quelante por incremento de los grupos funcionales como resultado de la reacción de oxidación. Por otra parte, la concentración de quitosano irradiado requerida para iones ferrosos en la actividad quelante se reduce más de 12 veces; lo que significa que al irradiar el quitosano se incrementa su actividad quelante.

El quitosano de bajo peso molecular y sus derivados fueron mejores que los de alto peso molecular y siguieron el orden NMCS > NPhCS > SuCS > CS [44].

Yu y col. (2012), estudiaron el efecto de las películas de 1% de quitosano con 0.04% de dióxido de nanosilicón sobre las propiedades cualitativas del jujube cosechado bajo temperatura ambiente.

Este resultado indica que el recubrimiento compuesto puede ajustar la permeabilidad de CO₂/O₂ y puede prolongar la vida útil del jujube.

La pérdida de peso del jujube recubierto con quitosano y nano-silicón fue la más baja. Después de 32 días la pérdida de peso del jujube recubierto fue solo 10.2%, el cual es 36.4% más bajo que el de control ($p < 0.05$).

El índice de rojo, que es una marca de grado de madurez en la mayoría de las frutas, es restringido para extender la vida útil del jujube fresco. El aumento del índice de rojo del jujube recubierto con la película de compuesto se hizo más lento, y por lo tanto la vida útil de jujube fue prolongada.

Las actividades de la catalasa (CAT), de la dismutasa superóxido (SOD), y de la peroxidasa (POD) del jujube recubierto con la película de compuesto fueron mayores, lo que podría eliminar eficazmente O₂ y H₂O₂. Lo que está probablemente relacionado con el revestimiento compuesto. Los jujubes recubiertos con quitosano y dióxido de nano-silicón serán una alternativa promisoriosa si el dióxido de nano-silicón es permitido para uso alimenticio [45].

Hui y col. (2012), evaluaron la actividad antioxidante del quitosano a partir de las larvas de *Musca doméstica L.* en dos ensayos de diferentes especies reactivas de oxígeno, y también analizaron los efectos inhibidores contra siete hongos.

El quitosano mostró una actividad antifúngica, especialmente en la baja concentración, ya que pudo inhibir significativamente el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*. El efecto de barrido del quitosano fue de 56.6% a una concentración de 0.5 mg/ml, mientras que el efecto de barrido del ácido ascórbico fue de 42.2% a la misma concentración. Las concentraciones inhibitorias medias del quitosano y ácido ascórbico fueron de aproximadamente 0.39 y 0.60 mg/ml, respectivamente.

El quitosano a partir de larvas de mosca doméstica tuvo actividad antifúngica similar contra *R. stolonifer*, *R. solani*, *T. cucumeris*, *S. sclerotiorum*, *C. lunata*, *S. rolfsii* y *F. fulva* la actividad antifúngica aumentó al incrementar la concentración. Las concentraciones inhibitorias medias contra *R. stolonifer*, *R. solani*, *T. cucumeris* y *S. sclerotiorum*, *C. lunata*, *S. rolfsii* y *F. fulva* fueron de 0.16, 1.47, 1.54, 2.29, 4.59, 10.01 y 6.77 mg/ml, respectivamente.

Sus observaciones parecen dar algo de apoyo a la utilización tradicional de las larvas de mosca doméstica en la medicina tradicional china, aunque su mecanismo farmacológico actualmente no se puede explicar en detalle, puesto que aún está en investigación. Este tipo de quitosano tiene el potencial como antioxidante natural para productos alimenticios funcionales o agentes antifúngicos. Los resultados antivirales del quitosano demostraron que podía reemplazar a los pesticidas químicos para prevenir y controlar la infección de insectos importantes para la economía (como el gusano de seda) causada por patógenos virales, evitando la contaminación del medio ambiente [46].

Ruiz-Navajas y col. (2013), evaluaron las películas comestibles de quitosano con aceites esenciales de dos hierbas aromáticas, *Thymus moroderi* y *Thymus piperella* para la inhibición del crecimiento de algunas cepas de bacterias, así como su contenido fenólico total y su actividad antioxidante para definir si pueden ser usadas como películas activas naturales en alimentos.

Las películas que contienen *T. piperella* (CH+TPEO), ($p < 0.05$) fueron más efectivas contra *Serratia marcescens* y *Listeria innocua* que las películas que contienen *T. moroderi* (CH+TMEO), mientras que no fueron encontradas diferencias estadísticas entre CH+TPEO y CH+TMEO contra *Aeromonas hydrophila* y *Achromobacter denitrificans*. Las películas que solo contienen quitosano no fueron efectivas contra alguna de estas bacterias, solo los organismos en contacto directo con los sitios activos del quitosano fueron inhibidos.

Las películas CH+TMEO mostraron menor actividad antioxidante ($p < 0.05$), a todas las concentraciones y todos los métodos usados, que CH+TPEO. La actividad antioxidante ocurre en una manera dependiente a la concentración.

Por otro lado, las películas de quitosano tienen permeabilidad selectiva para los gases (CO_2 y O_2) y buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofilia, son barreras pobres para la humedad, lo cual limita sus usos. Los resultados mostraron que las películas con aceites esenciales pueden ser usadas como películas activas debido a sus excelentes actividades antibacteriales y antioxidantes [47].

Pastor y col. (2013), propusieron que el resveratrol puede ser usado para minimizar o prevenir la oxidación lipídica en los alimentos, retardando la formación de productos de oxidación, manteniendo la calidad nutricional y prolongando la vida de la comida.

Estos autores desarrollaron y caracterizaron dos diferentes películas de compuestos poliméricos hechas con quitosano (CH) y metilcelulosa (MC) conteniendo diferentes cantidades de resveratrol. Este compuesto puede ser incorporado eficientemente dentro de ambas películas, pero provoca cambios estructurales en las matrices, las cuales se estiran menos (65-70% de reducción de deformación al romperse usando el mayor contenido de resveratrol) y son resistentes a las fracturas (26 y 54% de reducción tensil al romperse MC y CH, respectivamente, con el mayor contenido de resveratrol), más opacas (reducción significativa de transmitancia interna) y menos brillantes (entre un 60-65% reducción del brillo a la mayor cantidad de resveratrol). Estos cambios no afectaron negativamente la manipulación o apariencia de las películas.

Las propiedades de barrera de la película fueron apenas mejoradas por la presencia de resveratrol. Los análisis microbiológicos mostraron que ninguno de los composites tuvo actividad antifúngica contra *P. italicum* o *B. cinérea*. El resveratrol presenta actividad contra *P. expansum*, pero no hay información encontrada para *P. italicum*. Con respecto a *B. cinérea*, las concentraciones usadas fueron mayores que la concentración inhibitoria mínima (MIC) encontrada para estos hongos. Tomando en cuenta que la liberación de un agente activo dentro del medio involucra varios factores, tales como polaridad y solubilidad del migrante y del solvente, la baja afinidad química y la solubilidad del resveratrol con solventes acuosos explica el fenómeno observado.

Los resultados obtenidos indican que las películas basadas en resveratrol son adecuadas para propósitos de recubrimiento. El recubrimiento de alimentos con estas películas puede minimizar o prevenir los procesos de oxidación, manteniendo la calidad nutricional y la prolongación de la vida de estos [48].

Zhang y col. (2013), prepararon la nanodispersión del resveratrol para dar una alta estabilidad a la luz y una disolución en agua, mediante la precipitación del antisolvente en presencia de un polímero no tóxico y el secado por espray.

En este estudio, los estándares de selección de polímeros fueron: soluble en agua y no tóxico. Cuatro polímeros no tóxicos con buena solubilidad en agua, llamados HPMC, PVP, PEG400 y F188, fueron usados. La concentración de cada polímero fue de 9.0 mg/ml.

En el proceso de preparación, la porción hidrofílica de un polímero puede ser absorbida sobre la superficie de la partícula hidrofóbica precipitada, reduciendo la energía superficial interfacial de las superficies hidrofóbicas nuevamente formadas y dando una estabilización electrostática o estática en el medio acuoso, además de prevenir el crecimiento y la aglomeración.

El resveratrol nanodisperso (RND) estabilizado y con alta velocidad de disolución fue exitosamente preparado. Después de que el RND fue expuesto a la luz solar por 8 horas, el ingrediente activo en él pudo retener el 86% en peso, mientras que el resveratrol puro solo mantuvo el 20% en peso. El RND mostró una mayor velocidad de disolución,

rápidamente alcanzó el 72% de disolución dentro de 15 minutos, mientras que el resveratrol puro solo alcanzó el 52% de disolución en el mismo tiempo.

Mientras tanto, el RND mostró una mayor actividad antioxidante cuando fue añadido en un jugo intestinal artificial. Este alcanzó el 50% de eliminación de radicales dentro de 30 minutos. Sin embargo, sólo el 30% fue obtenido por el resveratrol puro. Además, el proceso puede ser un efectivo método para mejorar la estabilidad y la solubilidad en agua de los alimentos lipofílicos fotosensibles o nutraceuticos [49].

Spigno y col. (2013), investigaron la encapsulación del extracto uva fenólica para mejorar su eficiencia antioxidante y su solubilidad lipídica para la aplicación como agente preservante natural de la pasta de avellana. Se prepararon cuatro nanoemulsiones identificadas como: F1 nanoemulsión agua/aceite, F2 polvo obtenido de F1, F3 nanoemulsión etanol/aceite usando extracto de uva y F4 nanoemulsión etanol/aceite usando resveratrol. Todas las muestras fueron mezcladas con pasta de avellana a diferentes concentraciones fenólicas (desde 200 a menos de 10 ppm de ácido gálico equivalentes para los extractos).

La adición de extracto crudo de uva roja (CE) a pasta de avellana natural (NP) ha traído una inhibición significativa de la oxidación lipídica, a pesar de que el efecto antioxidante fue limitado por la separación de la pasta en dos fases (con aceite en la superficie) y el extracto rápidamente precipitó hacia el fondo de las muestras.

Similarmente a NP, en la pasta de avellana fluida enriquecida con monoglicéridos (FP) el CE no solubilizó completamente y con el tiempo éste tendió a precipitar, pero siguió mostrando un efecto antioxidante significativo. La oxidación fue observada solo después de un periodo de inducción (IP) de 14 días, después del cual éste siguió una tendencia similar a la observada con la NP, aunque la oxidación de la FP fue de cerca del 50% más lenta comparada con NP, ambos con y sin extracto (comparando valores de peróxidos o PV después de 35 días).

Las más alta actividad antioxidante fue la de F2, sin embargo la actividad antioxidante específica más alta fue mostrada por F4 debido a las bien conocidas propiedades antioxidantes del resveratrol, seguida de F1, F2 y F3, la emisión de etanol-

lípidos mostraron la más baja actividad antioxidante probablemente debido a la baja disponibilidad del extracto de orujo (relacionado con tamaño de partícula más alto) el cual fue completamente incrustado en la fase lipídica de aceite/lecitina ácido esteárico/cacahuete.

Este estudio mostró la eficiencia del extracto de orujo de uva fenólica en la mejora de la vida de la pasta de avellana mediante la inhibición de su oxidación, a pesar de la limitada solubilidad del extracto en una matriz de alto contenido lipídico [50].

Zhong y col. (2011), prepararon películas compuestas de quitosano y almidón de kudzu. Los efectos de ácidos para disolver el quitosano (ácido acético, ácido láctico y ácido málico) sobre las películas fueron investigadas. Los espectros FTIR mostraron que el almidón de kudzu y el quitosano pueden formar películas miscibles. Los datos de difracción de rayos X indicaron que la fase cristalina de cada componente por separado fue suprimida después del proceso de formación de películas. Las películas que contenían ácido málico como solvente mostraron la mejor actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, lo cual puede deberse a la más alta cantidad de grupos amino disueltos, la más baja sorción de agua y la mejor propiedad de barrera de agua. La película con ácido acético como solvente presentó la más fuerte propiedad mecánica, la más pequeña solubilidad, el color más ligero. La película hecha con una solución de ácido láctico mostró la mayor flexibilidad demostrada por la máxima elongación [51].

Matet y col. (2013), prepararon quitosano plastificado mediante una propuesta de mezclado térmico mecánico. Los efectos de los diferentes plastificantes no volátiles (glicerol, xilitol y sorbitol) fueron investigados. La microestructura y la morfología fueron determinados usando FTIR, XRD, TEM y SEM con el propósito de entender el mecanismo de plastificación. El sorbitol tiene el mayor peso molecular, lo que resultó en un quitosano plastificado con las mayores propiedades térmicas, mecánicas y reológicas. Por otra parte, la muestra plastificada con glicerol, el cual tiene el menor peso molecular, tuvo el más importante contenido de la fase amorfa y las más bajas propiedades térmicas, mecánicas y reológicas. También, cuando el contenido de poliol se incrementó en la formulación, el quitosano plastificado fue más amorfo y en consecuencia su procesamiento fue más fácil, mientras todas las propiedades mencionadas anteriormente decrecían [52].

Mathew y col. (2008), evaluaron las características de las películas de quitosano-almidón con ácido ferúlico, las cuales tienen aplicaciones como películas comestibles o recubrimiento. Las propiedades de barrera de las películas mezcladas fueron encontradas para mejorar considerablemente la incorporación de ácido ferúlico oxidado. Los estudios sobre la morfología de la superficie de las películas mediante microscopía de luz, SEM y AFM revelaron una suavidad relativa y una naturaleza homogénea; sin embargo, las películas con ácido ferúlico a altas concentraciones mostraron una separación de fases en las imágenes AFM. La naturaleza amorfa de las películas mostró una buena miscibilidad de los componentes como se reveló en los estudios de difracción de rayos X. Los estudios FTIR indicaron una interacción intermolecular entre los diferentes componentes. Se encontró que la incorporación de ácido ferúlico mejora las propiedades de barrera y la fuerza tensil de las películas de quitosano-almidón y disminuye significativamente la formación de peróxido lipídico. Un posible mecanismo para la prevención de la oxidación del ácido graso es la reducción de la permeabilidad al oxígeno que presentó la película [53].

Liu y col. (2013), clarificaron los cambios estructurales en películas de quitosano hechas con sorbitol, el grado de deacetilación del quitosano fue de 85 o 95%. La apariencia y las características de las películas fueron analizadas mediante SEM. El estudio mostró que el sorbitol es un buen agente de entrecruzamiento, el cual genera la miscibilidad deseada con ambos tipos de quitosano. La difracción de rayos X reveló un incremento en la cristalinidad para películas sin sorbitol y una disminución para películas con sorbitol comparado con el quitosano original. Los análisis FTIR mostraron que la adición del sorbitol no cambió la estructura química del quitosano y no se crearon nuevos tipos de enlaces durante la formación de la película. Los cambios en los átomos de carbonos circundantes analizados por CP/MAS ^{13}C NMR indicaron que la solución usada de ácido acético parcialmente destruyó el polvo de quitosano y algunos grupos protonizados, permitiendo que el sorbitol sea insertado y forme enlaces de hidrógeno en la matriz [54].

Capítulo 2 Metodología Experimental

En este capítulo se mencionan los diversos materiales y equipos que se utilizaron durante el desarrollo del proyecto, así como el procedimiento de obtención de películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales. También se describen las pruebas antimicrobianas realizadas a las películas y las técnicas de caracterización aplicadas a las películas en base a los resultados obtenidos en las pruebas antimicrobianas.

2.1 Materiales

Síntesis de películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales:

- Quitosano 85% deacetilado peso molecular medio marca Sigma-Aldrich
- Almidón de arroz 100% marca Sigma-Aldrich
- Ácido acético glacial 100% marca Fermont
- Glicerol 99.7% grado reactivo marca Fermont
- Frutas: arándano morado, betabel y pitaya
- Jugos orgánicos comerciales de arándano rojo y granada
- Orégano seco
- Cápsulas de resveratrol marca GNC

Pruebas antimicrobianas:

- Agar para método estándar marca Bioxon
- Agar dextrosa-papa para hongos marca Bioxon
- Agar bilis rojo violeta para coliformes totales marca Bioxon
- Ácido tartárico marca Mallinckrodt Chemical pureza 100% activo analítico

- Colonias de hongo *Penicillium notatum* (se observó presencia de *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* provenientes del medio ambiente)
- Agua purificada marca Epura
- Agua de horchata marca La Vitrolera
- Material de manejo para pruebas microbiológicas (cajas Petri, asas bacteriológicas, pipetas y tubos de dilución)

Reactivos para caracterizaciones:

- Etanol pureza mínima 99.7% marca Fermont
- Ácido gálico pureza 97.5% marca Sigma-Aldrich
- Reactivo de Folin-Denis marca Sigma-Aldrich (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos)
- Carbonato de sodio anhidro pureza $\geq 99.9\%$ marca Merck
- Soluciones buffer 4.0, 7.0 y 10.0 marca Hanna Instruments.

2.2 Síntesis de películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales

La solución de quitosano (2%, p/v) se preparó por dispersión. Dos gramos de quitosano se agregaron en 100 ml de solución de ácido acético (1%, v/v), en agitación constante durante 24 horas.

Una vez que el quitosano se disolvió completamente, la solución acuosa de almidón (2% p/v) se preparó por calentamiento, a una temperatura más alta que la de su gelatinización ($90 \pm 2^\circ \text{C}$) durante 20 min bajo agitación constante. Las soluciones se enfriaron aproximadamente a 25°C bajo agitación.

Las películas de quitosano-almidón se prepararon mezclando 40 ml de solución de quitosano al 2% (p/v) con 40 ml de una solución de almidón al 2% (p/v) con agitación constante. Se agregó glicerol al 0.25% (v/v) del total en solución. En el caso de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales se agregó extracto acuoso o jugo, equivalente al 0.5, 2 y 5% (v/v) del peso total de la mezcla.

Posteriormente, la mezcla se vertió en un recipiente de poliestireno a temperatura ambiente y se dejó secar por 2 semanas, aproximadamente [55].

2.3 Incorporación de antioxidantes naturales

Para la adición de los antioxidantes se estudió la posibilidad de hacer un extracto en agua e incorporarlo a la película, ya que ésta se sintetiza en agua. En el caso del orégano y el resveratrol (polvo proveniente de uvas) se utilizaron extractos acuosos al 5% (p/v). El extracto acuoso de resveratrol se preparó a temperatura ambiente y el extracto acuoso de orégano se calentó a 65 °C durante 5 min y se dejó enfriar a 25 °C. Ambos extractos se filtraron.

En el caso de la granada y el arándano rojo, se utilizaron jugos comerciales orgánicos. En el caso del betabel, la pitaya y el arándano morado se obtuvieron extractos a partir de las frutas frescas.

2.4 Pruebas antimicrobianas

Una vez obtenidas las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales, se analizó la eficacia antimicrobiana de cada polímero elaborado, a los cuales se les aplicó el método de cultivo de vertido en placa, usando agar dextrosa-papa, agar bilis rojo violeta y agar para método estándar. Para las pruebas antimicrobianas contra coliformes totales y hongos, fue necesario realizar diversas diluciones con el objetivo de facilitar el conteo de colonias. Las unidades formadoras de colonias fueron contadas a simple vista. Previamente, se esterilizó por vía seca el material de manejo en una estufa durante 2 horas a 150 °C.

Durante las pruebas antimicrobianas, la zona de inhibición de cada película fue medida utilizando un Vernier con escala milimétrica, considerando como zona de inhibición la diferencia entre el diámetro de la zona sin crecimiento de microorganismos y el diámetro del disco [56]. Se realizaron varias mediciones y se muestran como resultados los valores promedios.

2.4.1 Pruebas de contaminación previa

Esta prueba se realizó para saber si las películas se encontraban contaminadas antes de iniciar con los análisis de inhibición microbiana, ya que, de ser así, esto podría afectar en las pruebas antimicrobianas siguientes. El procedimiento se llevó a cabo colocando 5 ml de agua destilada en un tubo, se esterilizó y se colocó dentro de éste un cuadro de 1 cm² de la película, se agitó y se dejó reposar durante un mínimo de 24 horas. Se sembró, colocando como muestra un mililitro del agua contenida en los tubos con la película, con el agar respectivo (ya sea para mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos), observándose el crecimiento de acuerdo a las normas indicadas para cada microorganismo. Este procedimiento se llevó a cabo para cada película.

2.4.2 Cultivo de mesofílicos aerobios

Para el cultivo de mesofílicos aerobios se utilizó Agar para método estándar. Por cada 100 ml se utilizaron 2.35 g de agar en 100 ml de agua destilada, la solución se calentó a 100 °C y se dejó en ebullición por 1 minuto, bajo agitación constante. El agar se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Para el cultivo de estos microorganismos se tomó muestra de:

- Agua purificada marca Epura

En el caso de la muestra de agua purificada, se utilizó 1 ml de agua en cada caja petri y se agregó agar para método estándar. Se movió la caja Petri 7 veces hacia la derecha, 7 veces hacia la izquierda y 7 veces arriba-abajo para mezclar la muestra y el agar. Se dejó

solidificar. Los mesofílicos aerobios se estudiaron a 37 °C durante 48 horas, se observó la ausencia o inhibición del crecimiento de los diversos microorganismos [57].

2.4.3 Cultivo de coliformes totales

Se utilizó agar bilis rojo violeta. Por cada 100 ml se utilizaron 4.15 g de agar en 100 ml de agua destilada, la solución se calentó a 100 °C y se dejó en ebullición por 1 minuto, bajo agitación constante. El agar y los tubos de dilución (con 10 ml de agua destilada) se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Se utilizó horchata como muestra debido a que esta bebida presentó un alto conteo de UFC de coliformes totales durante análisis previos. Se puso 1 ml de agua de horchata en el tubo de dilución con 10 ml de agua destilada. Después un 1 ml de la primera dilución se depositó en otro tubo de dilución. Finalmente, 0.1 ml de la segunda dilución fueron añadidos a cada caja Petri. Se agregó agar. Se movió la caja Petri 7 veces hacia la derecha, 7 veces hacia la izquierda y 7 veces arriba-abajo para mezclar el agar y la muestra. Se dejó solidificar. Los coliformes totales se estudiaron a 37 °C durante 24 horas, se observó la ausencia o inhibición del crecimiento de los diversos microorganismos [58].

2.4.4 Cultivo de hongos

Para el cultivo de hongos se utilizó agar dextrosa-papa. Por cada 100 ml de solución de agar se utilizaron 3.9 g de agar en 100 ml de agua destilada, se sometió a calentamiento hasta 100 °C y ebullición por 1 minuto. Se agitó constantemente.

Se preparó ácido tartárico al 10% utilizando 1 gr de ácido tartárico en 10 ml de agua destilada. El agar, el ácido tartárico y los tubos de dilución (con 10 ml de agua destilada) se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos. Al enfriarse el agar dextrosa-papa, se agregaron 1.4 ml de ácido tartárico al 10% por cada 100 ml de agar, esto con el objetivo de obtener un valor de pH= 3.5, aproximadamente.

Para el cultivo de estos microorganismos se tomaron muestras de:

- Colonia de hongos *Penicillium notatum*.
- Se presentó crecimiento de otras especies de hongos, tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, los cuales son abundantes en la naturaleza.

En el caso de la muestra de hongos, se raspó con un asa bacteriológica tomando una muestra de ésta y se colocó en el tubo de ensayo para hacer una dilución en 10 ml de agua destilada y esterilizada. Después, 1 ml de la primera dilución se colocó en otro tubo. Finalmente, 1 ml de la segunda dilución se agregó a cada caja Petri. Se agregó agar dextrosa-papa hasta cubrir el fondo de la caja. Se movió la caja 7 veces hacia la derecha, la izquierda, arriba, abajo para mezclar la muestra y el agar. Las muestras de hongos se estudiaron a 25 °C durante 5 días = 120 horas [59].

Las pruebas antimicrobianas se basaron en el método de discos utilizado en las pruebas de sensibilidad microbiana determinadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se colocó un círculo de cada muestra en la caja Petri con medio de cultivo y muestra, para su posterior observación en un periodo de tiempo determinado en la bibliografía para cada tipo de microorganismo [60].

Se caracterizaron las muestras tomadas de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales que dieron resultados positivos durante las pruebas antimicrobianas.

2.5 Métodos de caracterización

El análisis de las propiedades y características de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales se llevó a cabo mediante el uso de los métodos de caracterización tales como: Medición de espesor, Densidad Aparente, Medición de pH, Propiedades ópticas, Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis), Espectroscopia Raman, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Análisis Dinámico Mecánico (DMA), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Análisis Estadístico.

2.5.1 Medición de espesor

La medición del espesor se llevó a cabo utilizando un micrómetro manual modelo 264105 marca OBI con un rango de medición de 0-25 mm. Se consideraron 5 mediciones: una al centro y cuatro alrededor del perímetro (Figura 2.1), y se consideró como el espesor al promedio de las cinco mediciones [61-62].

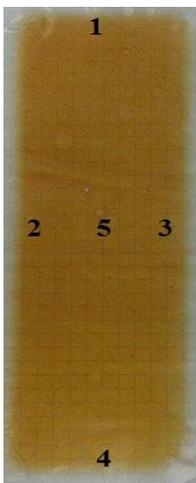


Figura 2.1 Puntos de medición de espesor.

2.5.2 Densidad aparente

La densidad aparente de las películas se midió de acuerdo con el procedimiento utilizado por Ahmed y col (2016). Cada muestra de película se cortó y se pesó. También se midió su diámetro y altura. La densidad aparente (ρ) se obtuvo mediante la Ecuación (1):

$$\rho = W / [\pi \times (D/2)^2 \times H] \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

D = diámetro de la muestra

H = altura de la muestra

W = peso de la muestra [65].

2.5.3 Medición de potencial de hidrógeno (pH)

Para observar la relación del pH con las propiedades antimicrobianas de las películas, se midieron los valores de pH después de la síntesis (día 1) y cuando las películas ya están secas (día 15) utilizando un equipo medidor de pH modelo HI 2212 marca Hanna Instruments. Para comprobar las mediciones se utilizaron tiras reactivas de pH marca Mcolorplast.

Para determinar el pH de las películas después de la síntesis (día 1), se sumergió el electrodo en la mezcla de cada película. Se tomaron dos mediciones en ese momento.

Para determinar el pH de las películas cuando ya están secas (día 15), se siguió el procedimiento descrito a continuación: medir el pH de las muestras secas de acuerdo a lo indicado en la norma ASTM D 6739 Standard Test Method for Silica—pH Value (ver Anexo A de la norma) que coincide con el procedimiento estipulado en la norma NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos (Figura 2.2).

Se hirvió agua destilada durante 10 minutos, en un recipiente tapado. Se tomaron 0.5 g de la muestra pulverizada previamente con un mortero, y se añadieron a un recipiente con 10 ml de agua neutralizada. Con el recipiente tapado, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se midió a temperatura ambiente utilizando un medidor de pH. Se tomaron dos mediciones en el día 15, después de este proceso [64-65].



Figura 2.2 Procedimiento para medir pH en muestras sólidas.

2.5.4. Propiedades ópticas (transparencia y opacidad)

Se cortó una muestra en forma rectangular de tal tamaño que pudo ser introducida en la celda de cuarzo del Espectrofotómetro UV-vis marca Cintra modelo 303. Se utilizó aire como referencia. Los espectros de cada película se obtuvieron en un rango de longitud de onda de 200-800 nm. Los resultados se obtuvieron en porcentaje de transmitancia (%T). Los estudios se realizaron por triplicado para cada muestra y se calculó un promedio [66].

Los valores de transparencia a 600 nm (T_{600}) se obtuvieron utilizando la Ecuación (2):

$$T_{600} = \frac{-\log \%T}{b} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

%T= Porcentaje de transmitancia

b= Espesor de la película, mm

Los valores de opacidad (O) se obtuvieron utilizando el valor promedio de absorbancia a 500 nm y el espesor en la Ecuación (3):

$$O = A_{500} \times b \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

A_{500} = Absorbancia a 500 nm

b= Espesor de la película, mm [62,67]

2.5.5 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopía Infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro IR es comúnmente obtenido mediante el paso de la radiación infrarroja a través de una muestra, determinando que fracción de la radiación incidente es absorbida a una energía particular. La energía a la cual algún pico en un

espectro de absorción aparece corresponde a la frecuencia de vibración de una parte de la molécula de la muestra. En un equipo FTIR, la radiación emerge desde una fuente y es pasada a través de un interferómetro hacia la muestra antes de alcanzar un detector. Sobre la amplificación de la señal, en la cual las contribuciones de alta frecuencia han sido eliminadas por un filtro, los datos son convertidos a digitales mediante un convertidor análogo-digital y transferidos a la computadora mediante la Transformada de Fourier [68].

Para la determinación de los grupos funcionales presentes en las películas se utilizaron dos equipos FTIR: 1) modelo Spectrum 100 marca Perkin Elmer y 2) modelo Spectrum one marca Perkin Elmer. El método utilizado fue el de Reflectancia Total Atenuada (ATR), con celda de diamante, con 12 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de 4000 a 600 cm^{-1} .

2.5.6 Espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis)

En general, cuando se miden espectros UV-visible, sólo es deseable que ocurra absorción. Como la luz es una forma de energía, la absorción de la luz por la materia causa que aumente el contenido de energía de las moléculas (o átomos). La energía potencial total de una molécula, generalmente se representa como la suma de sus energías electrónica, vibracional y rotacional. En algunas moléculas y átomos, los fotones de luz UV y visible tienen suficiente energía para causar transiciones entre los diferentes niveles. La longitud de onda de la luz absorbida es aquella que tiene la energía requerida para mover un electrón desde un nivel de energía inferior a uno superior. Un espectrofotómetro es un instrumento para medir la transmitancia o absorción de una muestra, en función de la longitud de onda de la radiación electromagnética. Los componentes clave de un espectrofotómetro, son: una fuente que genera una banda ancha de radiación electromagnética, un dispositivo de dispersión que selecciona una longitud de onda particular (o más correctamente, una banda de ondas) de la radiación de la fuente, un área de muestra, uno o más detectores para medir la intensidad de la radiación y otros componentes ópticos, como lentes o espejos, transmiten la luz a través del instrumento [69].

Para la determinación de la cantidad de antioxidantes presentes en las películas se utilizó un equipo de Espectroscopía UV-vis marca Cintra modelo 303; el cual cuenta con

una lámpara de deuterio y una de wolframio, utilizando una celda de cuarzo de 10 mm para el estudio. Las muestras se analizaron en un rango de longitud de onda comprendido entre 200 y 800 nm.

Para llevar a cabo un análisis cualitativo en el equipo UV-vis se prepararon extractos de todas las películas, ya que los antioxidantes son de naturaleza polar, se utilizó etanol para extraerlos mediante el método descrito a continuación: se pesaron 0.25 g (aproximadamente) de cada muestra y se agregaron 4 ml de etanol. Se dejó en baño a 25 °C y 90 rpm durante 10 minutos (se usó un baño de agitación mecánica modelo 12050-00 Cicular marca polystat). Después de esto, se centrifugó cada extracto a 19 °C y 13000 rpm durante 10 minutos (se usó una centrifuga modelo Microlite-RF marca Thermo). La operación se repitió dos veces más para obtener un aproximado de 10 ml de cada extracto. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos de vidrios y se protegen contra la luz [70].

La cantidad de antioxidantes naturales (en la región visible) fue determinada usando una modificación del método utilizado por Singleton y col. (1965), cambiando el reactivo de Folin-Ciocalteu por el reactivo de Folin-Denis. El método es descrito a continuación [71]. Los análisis se hicieron por triplicado: a 0.3 ml de extracto se le agregaron 1.5 ml uno de reactivo de Folin-Denis (diluido 10 veces en agua) y 1.2 ml carbonato de sodio al 7.5% p/v. Las muestras fueron agitadas, cubiertas con parafilm y se dejaron en reposo por 30 minutos. Se midió la absorción a 765 nm. El contenido total de polifenoles fue expresado en equivalentes mg de ácido gálico [71-73]. El valor de medición de absorción también es indicado en otros estudios [74-75]. Se utilizó ácido gálico como estándar para realizar una curva de calibración, usando soluciones con concentraciones de 0, 40, 80, 120, 160 y 200 mg/l. Las soluciones se analizaron por triplicado (considerando las mismas cantidades anteriormente mencionadas) y se utilizó el promedio de la absorbancia a 765 nm para construir la gráfica. Se obtuvo un valor de regresión mayor a 0.99 [76-77].

2.5.7 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia de la luz incidente. Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no destructiva [78].

Para llevar a cabo este análisis se utilizó un espectroscopio Raman Micro Raman modelo inVia marca RENISHAW y se consideraron las siguientes condiciones: 633 nm láser He-Ne, 3-5% de potencia, tiempo de integración de 10-20 segundos, de 3-5 barrido en cada punto y un objetivo de 50x.

2.5.8 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En el microscopio electrónico de barrido (SEM), el haz electrónico, atraviesa la columna y llega a la muestra. Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz, de manera que barra la muestra punto a punto. De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores específicos para cada una de ellas. El detector capta una señal y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla (CRT). El barrido del haz está sincronizado con el barrido del CRT y produce una relación uno a uno entre puntos de la muestra y puntos en el CRT.

La interacción haz incidente-muestra produce una variedad de señales, las cuales brindan distinta información sobre la superficie de la muestra. Dichas señales pueden ser captadas por sus correspondientes detectores. El microscopio electrónico de barrido -SEM- es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies [79].

Para estudiar la morfología de las películas se utilizaron dos equipos SEM: 1) modelo JSM 7401F marca JEOL y 2) modelo JSM 7100F marca JEOL usando magnificaciones de 500x, 750x, 1500x y 5000x. Las imágenes se obtuvieron a partir de electrones secundarios, con un voltaje de aceleración de 2 y 5 kV a alto vacío y diferentes magnificaciones. Se utilizó una cinta conductora de carbón para sujetar la muestra.

2.5.9 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

El Análisis Dinámico Mecánico es la técnica que consiste en aplicar una tensión o una deformación a una muestra y analizar la respuesta para obtener datos de formación y un ángulo de fase. Los datos obtenidos permiten el cálculo de propiedades dinamo-mecánicas como el damping o tangente delta (δ) así como datos de viscosidad y del módulo complejo. Los datos del módulo en la forma de módulo de almacenamiento son conceptualmente equivalentes a aquellos recolectados a partir de pruebas mecánicas tradicionales y dan una medida de la fuerza y rigidez del material. Esto permite que el DMA sea utilizado para predecir qué tan buenas propiedades mecánicas tiene un material [80].

Para la determinación de las propiedades mecánicas, así como la influencia de la presencia de los extractos presentes en las películas se utilizó un equipo de Análisis Mecánico Dinámico modelo DMA 800 marca Perkin Elmer. Rango de Temperatura: 25-200 °C. Rampa: 10 °C por min, atmósfera de N₂. Se realizaron dos análisis para cada muestra.

2.5.10 Análisis Termogravimétrico (TGA)

La Termogravimetría o Análisis Termogravimétrico proporciona una medición cuantitativa de cualquier cambio de peso asociado a transiciones térmicamente inducidas. Las curvas termogravimétricas son características de un compuesto o material dado debido a la secuencia única de las transiciones físicas y las reacciones químicas que ocurren sobre diferentes intervalos definidos de temperatura.

En esta caracterización el peso de la muestra se registra continuamente a medida que se incrementa la temperatura. Las muestras se colocan en un crisol o platillo poco profundo que se introduce en un horno sobre un soporte de cuarzo unido a una balanza de registro automático. El análisis térmico es afectado por las condiciones experimentales [81].

Para observar la estabilidad térmica de las películas se usó un equipo de análisis termogravimétrico modelo TGA Q500 marca TA Instruments. Las condiciones que se utilizaron son las siguientes: atmósfera de aire a 100 ml/min, intervalo de estudio de 25° a 600 °C, y rampa de calentamiento a 10 °C/min. El tamaño de las muestras varió entre 15 y 22 mg.

2.5.11 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando Excel (Microsoft, versión 2013). Los valores de las tablas 3.2-3.8, 3.10, 3.12-3.13 fueron expresados incluyendo datos de desviación estándar. El análisis de varianza multifactorial (ANOVA) se realizó usando Minitab (versión 16) para determinar si la cantidad y el tipo de extracto, el período de almacenamiento o una interacción de estos factores tienen un efecto significativo sobre los valores de pH de las películas. Se consideraron significativas las diferencias superiores a 0.05 ($p < 0.05$) utilizando el método Tukey.

Capítulo 3 Resultados y Discusión

3.1 Identificación de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales

Se prepararon 21 películas con solución de quitosano al 2%, solución de almidón al 2% de almidón, 0.2 ml de glicerol y adicionando el extracto en una cantidad de 0.4, 1.6 y 4 ml. Asimismo, se elaboró una película con quitosano al 2% y solución de almidón al 2% para ser utilizada como referencia, obteniéndose un total de 22 películas. En la tabla 3.1 se presentan las claves con las que se identificaron para las diferentes pruebas.

Tabla 3.1 Nomenclatura de las películas.

| Número | Clave | Número | Clave |
|--------|---------|--------|--------|
| 1 | QS2 | 12 | QSG2 |
| 2 | QSA0.5 | 13 | QSG5 |
| 3 | QSA2 | 14 | QSO0.5 |
| 4 | QSA5 | 15 | QSO2 |
| 5 | QSAm0.5 | 16 | QSO5 |
| 6 | QSAm2 | 17 | QSP0.5 |
| 7 | QSAm5 | 18 | QSP2 |
| 8 | QSB0.5 | 19 | QSP5 |
| 9 | QSB2 | 20 | QSR0.5 |
| 10 | QSB5 | 21 | QSR2 |
| 11 | QSG0.5 | 22 | QSR5 |

Donde Q= quitosano, S= almidón, A= arándano rojo, Am= arándano morado, B= betabel, G = granada, O= orégano, P= pitaya, R= resveratrol; el número representa el porcentaje en peso usado del extracto o jugo agregado.

3.1.1 Características de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales.

La película de quitosano-almidón QS2 es translúcida, flexible y tiene una coloración amarilla atribuible a la solución de quitosano. No existe un cambio verdaderamente notable entre el día de su preparación y el día 15, esta estabilidad de color se atribuye a que no contiene ningún extracto natural (figura 3.1).

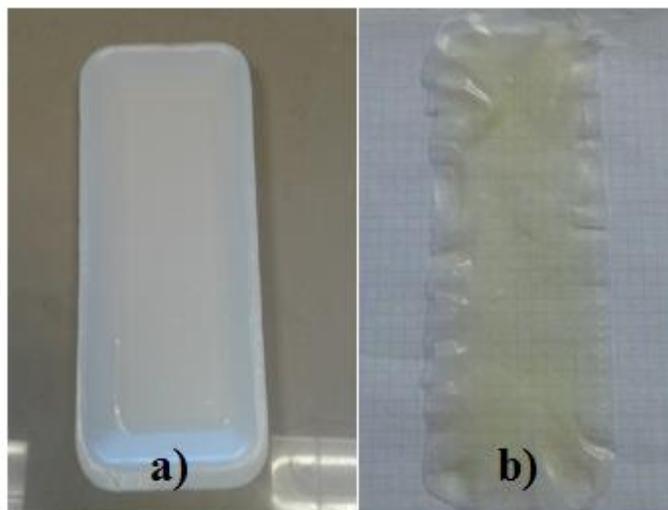


Figura 3.1 Aspecto de la película de quitosano-almidón QS2, a) día 1 y b) día 15.

Las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales presentan coloraciones diversas y distintos niveles de translucidez. Esto se atribuye a la coloración que cada extracto da a la mezcla de quitosano-almidón, otros factores que intervienen en la coloración de las películas son el tipo de extracto, la cantidad agregada, la estabilidad de los antioxidantes ante la luz, temperatura, presencia de oxígeno y el tiempo de secado de las películas.

Las películas con jugo de arándano rojo QSA0.5, QSA2 y QSA5 (figura 3.2), son translúcidas, QSA0.5 es flexible, QSA2 y QSA5 son más rígidas y presentan una coloración que va de amarilla (en el caso de QSA0.5), amarillo-café (en el caso de QSA2) y a una coloración café rojizo (en el caso de QSA5) que aumenta en relación a las distintas cantidades de jugo de arándano rojo.

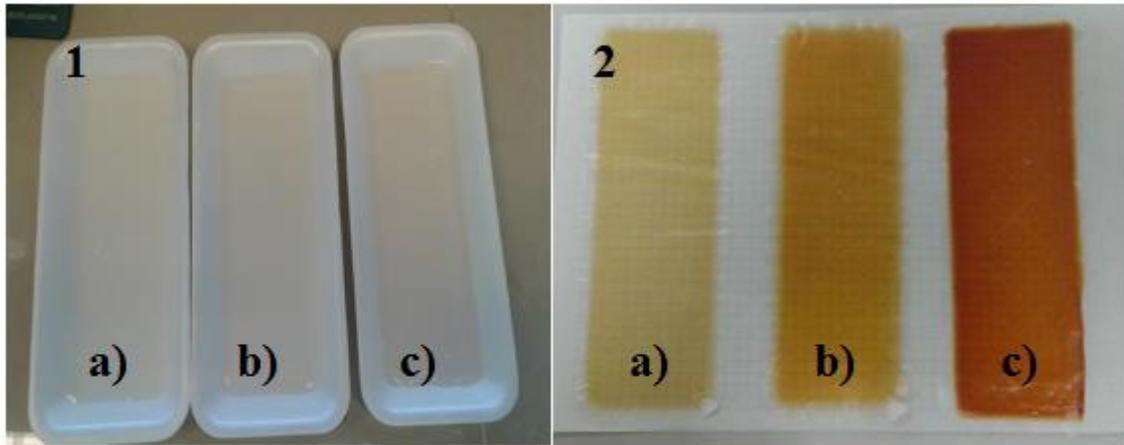


Figura 3.2 Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de arándano rojo, 1: día 1 a) QSA0.5, b) QSA2 y c) QSA5; 2: día 15 a) QSA0.5, b) QSA2 y c) QSA5.

Las películas con jugo de arándano morado QSA_m0.5, QSA2 y QSA5 (figura 3.3) son translúcidas, flexibles y tiene una coloración que va de amarilla (en el caso de QSA_m0.5) a una coloración café rojizo más intensa que en la películas de arándano rojo (en el caso de QSA2 y QSA5) atribuible a las distintas cantidades de jugo de arándano morado.

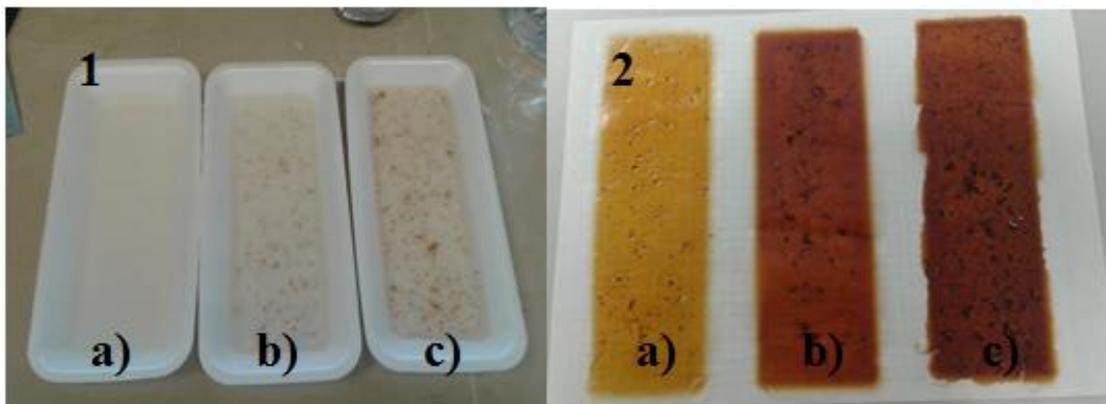


Figura 3.3 Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de arándano morado, 1: día 1 a) QSA_m0.5, b) QSA_m2 y c) QSA_m5; 2: día 15 a) QSA_m0.5, b) QSA_m2 y c) QSA_m5.

Las películas con jugo de betabel QSB0.5, QSB2 y QSB5 (figura 3.4), son translúcidas, flexibles y tiene una coloración que va de amarillo (en el caso de QSB0.5) a una coloración café rojizo (en el caso de QSB2 y QSB5) atribuible a las distintas cantidades de jugo de betabel.

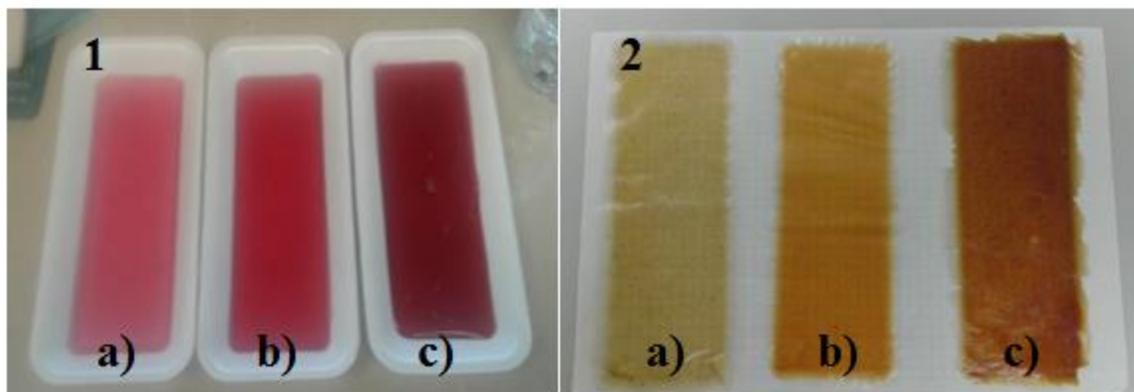


Figura 3.4 Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de betabel, 1: día 1 a) QSB0.5, b) QSB2 y c) QSB5; 2: día 15 a) QSB0.5, b) QSB2 y c) QSB5.

Las películas con jugo de granada QSG0.5, QSG2 y QSG5 (figura 3.5) son translúcidas flexibles y tiene una coloración que va de amarilla (en el caso de QSG0.5) a una coloración amarillo-café (en el caso de QSG2) y café rojizo (en el caso de QSG5).

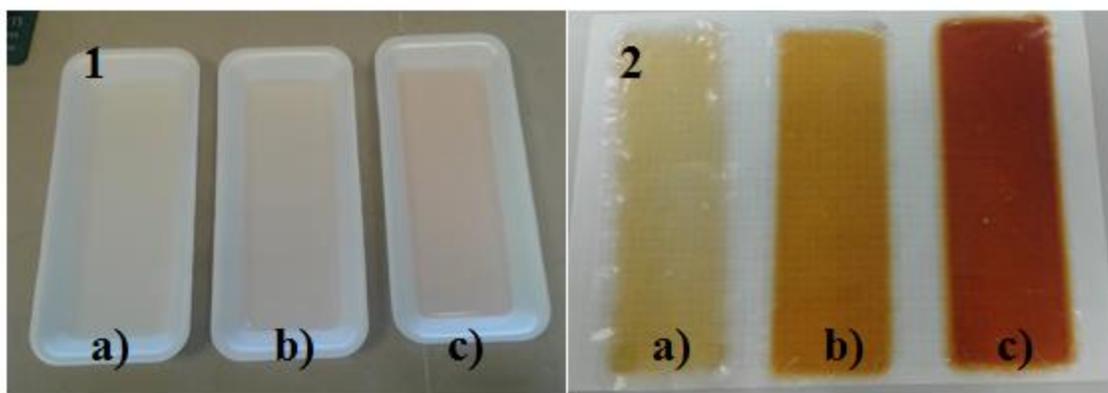


Figura 3.5 Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de granada, 1: día 1 a) QSG0.5, b) QSG2 y c) QSG5; 2: día 15 a) QSG0.5, b) QSG2 y c) QSG5.

Las películas con extracto acuoso de orégano QSO0.5, QSO2 y QSO5 (figura 3.6) son translúcidas, flexibles y tiene una coloración que va de ligeramente amarilla (en el caso de QSO0.5 y QSO2) a una coloración café claro (en el caso de QSO5) atribuible a las distintas cantidades de extracto acuoso de orégano.

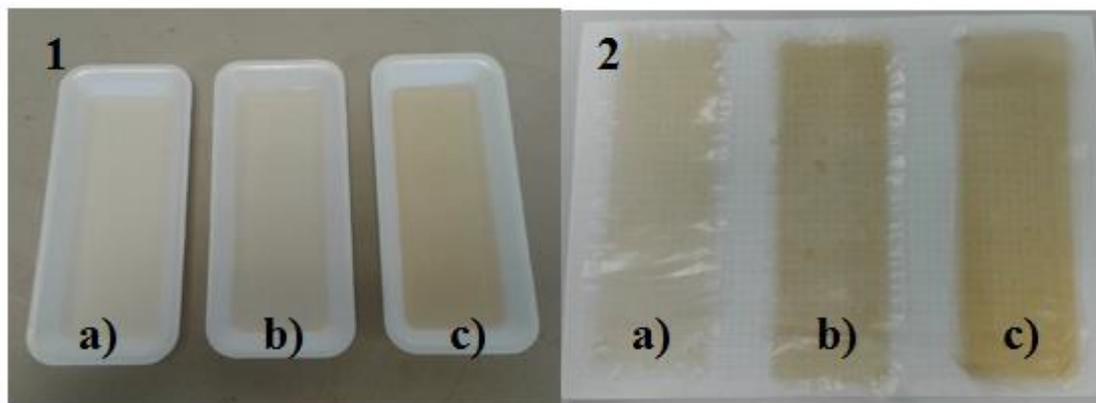


Figura 3.6 Aspecto de las películas de quitosano-almidón con extracto acuoso de orégano, 1: día 1 a) QSO0.5, b) QSO2 y c) QSO5; 2: día 15 a) QSO0.5, b) QSO2 y c) QSO5.

Las películas con jugo de pitaya QSP0.5, QSP2 y QSP5 (figura 3.7) son translúcidas, más flexibles y tiene una coloración que va de amarillo ámbar (en el caso de QSP0.5) a una coloración café rojizo (en el caso de QSP2 y QSP5) atribuible a las distintas cantidades de jugo de pitaya.

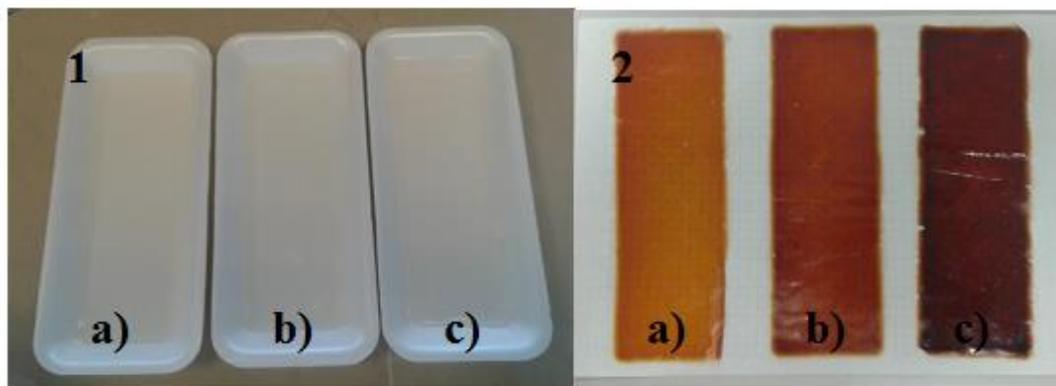


Figura 3.7 Aspecto de las películas de quitosano-almidón con jugo de pitaya, 1: día 1 a) QSP0.5, b) QSP2 y c) QSP5; 2: día 15 a) QSP0.5, b) QSP2 y c) QSP5.

Las películas con extracto acuoso de resveratrol QSR0.5, QSR2 y QSR5 (figura 3.8) son translúcidas, flexibles y tiene una coloración que va de ligeramente amarilla (en el caso de QSR0.5 y QSR2) a una coloración café claro (en el caso de QSR5) atribuible a las distintas cantidades de extracto acuoso de resveratrol.

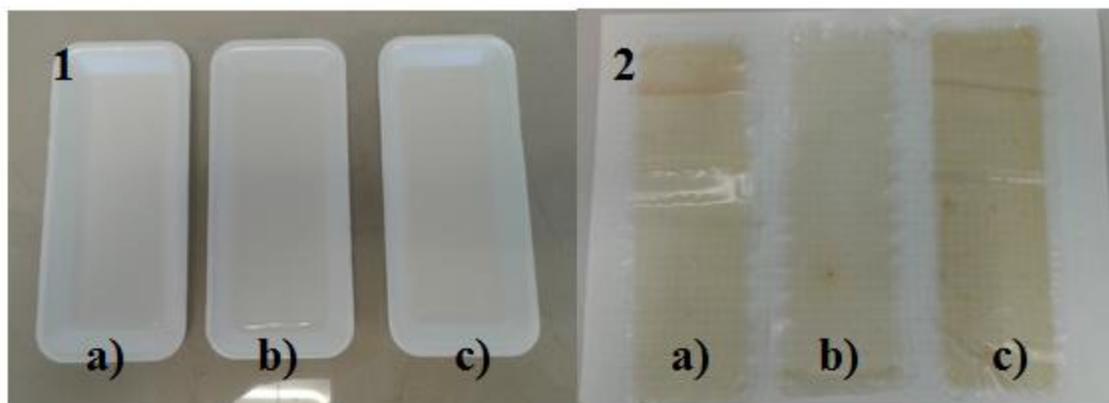


Figura 3.8 Aspecto de las películas de quitosano-almidón con extracto acuoso de resveratrol, 1: día 1 a) QSR0.5, b) QSR2 y c) QSR5; 2: día 15 a) QSR0.5, b) QSR2 y c) QSR5.

3.1.2 Cambio de coloración de las películas

Existe una diferencia significativa entre la coloración de las películas con arándano rojo, arándano morado, betabel, granada y pitaya, ya que contienen antocianinas y betalainas (antioxidantes y pigmentos naturales presentes en el jugo) los cuales sufren cierta degradación de color o pardeamiento ante el aumento del valor de pH, como la película aún tiene un pH ácido presenta una coloración derivada de los antioxidantes. La presencia de luz también ocasiona una degradación de los antioxidantes, la combinación de vitamina C y oxígeno puede potenciar la degradación de los antioxidantes. Sin embargo, la presencia de azúcares es un gran factor estabilizante de los antioxidantes [82-85]. En el caso de las películas de orégano, no se muestran cambios en la coloración de éstas debido a que el timol y el carvacrol son incoloros [31]. En el caso de la película con resveratrol se observa un cambio en la coloración debido a que el resveratrol (componente de color blanquecino en combinación con los colorantes de la uva, produce una película con coloración café muy claro) es inestable ante la luz, y también se ve afectado por cambios en el pH [86]. El

aumento en los valores de pH que contribuyeron al cambio de coloración de la mayoría de las películas (sección 3.4).

3.2 Pruebas antimicrobianas

3.2.1 Identificación de microorganismos

Los mesofílicos aerobios (figura 3.9) constituyen un amplio grupo de microorganismos, que no pueden ser identificados por completo. Se caracterizan por ser colonias circulares, pequeñas y de color blanco-amarillento.



Figura 3.9 Aspecto de los mesofílicos aerobios.

En el caso de bacterias coliformes (figura 3.10), se identificaron debido a su tamaño pequeño, formas circulares y de color rosa fuerte.



Figura 3.10 Aspecto de colonias de bacterias coliformes.

Se identificaron las especies de hongos mediante el uso de un Atlas ilustrado. En el caso de las cajas petri con muestra de hongos se identificaron 3 especies: *P. notatum*, *A. fumigatus* y *A. niger* [87].

La especie conocida como *P. notatum* (figura 3.11) se identificó debido a su tamaño de 1-3 cm de diámetro aproximadamente, su coloración es verde-azulada y amarillenta. Tiene pliegues rugosos radiales. Su periferia es blanca [87].

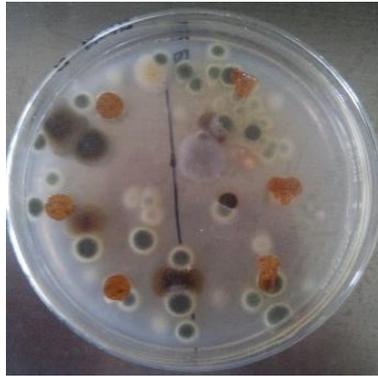


Figura 3.11 Aspecto de colonias de *P. notatum*.

La especie conocida como *A. fumigatus* (figura 3.12) se identificó debido a su tamaño de 3 cm de diámetro aproximadamente, aspecto aterciopelado, coloración verde-azulada y verde-amarillada. Presentó una coloración blanca en su periferia [87].

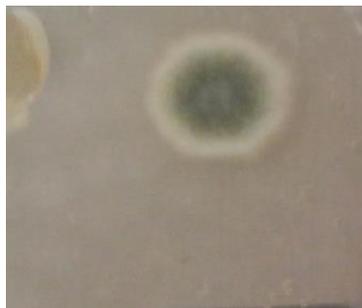


Figura 3.12 Aspecto de colonias de *A. fumigatus*.

La especie conocida como *A. niger* (figura 3.13) se identificó debido a su tamaño entre 3 y 5 cm de diámetro, aspecto aterciopelado, color negro, el reverso de la colonia presentó un color café/ámbar [87].



Figura 3.13 Aspecto de colonias de *A. niger*.

La importancia de identificar este tipo de hongos radica en que se encuentran presentes ampliamente en la Naturaleza, y son los principales hongos que se desarrollan durante el proceso de descomposición de los alimentos. Un posible problema en la interacción de estas películas y los hongos puede ser la presencia de almidón (ya que está compuesto por unidades de sacáridos, los cuales son fuente de alimento para estos microorganismos), se esperaba que la adición de antioxidantes naturales mejorara la inhibición o eliminación de estos microorganismos. Esto pudo lograrse como puede observarse en los resultados indicados en las tablas 3.2-3.3.

3.2.2 Pruebas de contaminación previa

Una vez terminada la siembra de microorganismos y después del periodo de incubación de cada uno (48 horas para mesofílicos aerobios, 24 horas para coliformes totales y 120 horas para hongos), se obtuvieron los siguientes resultados, indicados en la tabla 3.2.

Se consideran como películas contaminadas aquellas que cumplan con las siguientes especificaciones, de acuerdo con el punto 11.- Informe de prueba de cada norma oficial mexicana aplicable para cada tipo de microorganismo:

- Para mesofílicos aerobios: Aquellas placas que contengan más de 25 colonias.
- Para coliformes totales: Placas que contengan 1 o más colonias.

- Para hongos: Considerar las placas con más de 10 colonias.

Las películas marcadas en negritas en la tabla 3.2 son aquellas que obtuvieron resultados que cumplen con las especificaciones indicadas anteriormente (se consideraron películas contaminadas) [57-59].

Tabla 3.2 Resultados de pruebas de contaminación previa.

| Película | Mesofílicos aerobios (UFC) | | | Coliformes Totales (UFC) | | | Hongos (UFC) | | |
|----------|----------------------------|-----------|----------------|--------------------------|----------|----------------|--------------|-----------|----------------|
| | Test 1 | Test 2 | Valor promedio | Test 1 | Test 2 | Valor promedio | Test 1 | Test 2 | Valor promedio |
| QS2 | 1 | 4 | 2.5±2.12 | <1 | 2 | 1±1.41 | 10 | 3 | 6.5±4.95 |
| QSA0.5 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | <1 | <1±0 |
| QSA2 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | <1 | <1±0 | 1 | 1 | 1±0 |
| QSA5 | 1 | 1 | 1±0 | <1 | <1 | <1±0 | 9 | 14 | 11.5±3.54 |
| QSAm0.5 | <1 | 1 | 0.5±0.71 | 1 | <1 | 0.5±0.71 | 1 | 2 | 1.5±0.71 |
| QSAm2 | <1 | <1 | 0±0 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | 1 | 0.5±0.71 |
| QSAm5 | <1 | <1 | 0±0 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | 1 | 0.5±0.71 |
| QSB0.5 | 1 | 1 | 1±0 | 1 | <1 | 0.5±0.71 | <1 | 17 | 8.5±12.02 |
| QSB2 | 2 | <1 | 1±1.41 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | 0 | <1±0 |
| QSB5 | 3 | 1 | 2±1.41 | <1 | <1 | <1±0 | 1 | 5 | 3±2.83 |
| QSG0.5 | 2 | 3 | 2.5±0.71 | <1 | <1 | <1±0 | 8 | 3 | 5.5±3.54 |
| QSG2 | <1 | 26 | 13±18.38 | <1 | <1 | <1±0 | 2 | 2 | 2±0 |
| QSG5 | <1 | 31 | 15.5±21.92 | <1 | <1 | <1±0 | 6 | 7 | 6.5±0.71 |
| QSO0.5 | <1 | 1 | 0.5±0.71 | <1 | <1 | <1±0 | 3 | 2 | 2.5±0.71 |
| QSO2 | 10 | <1 | 5±7.07 | <1 | <1 | <1±0 | 3 | 5 | 4±1.41 |
| QSO5 | 3 | 27 | 15±16.97 | <1 | <1 | <1±0 | 4 | 11 | 7.5±4.95 |
| QSP0.5 | <1 | 2 | 1±1.41 | <1 | 2 | 1±1.41 | 2 | <1 | 1±1.41 |
| QSP2 | <1 | 1 | 0.5±0.71 | <1 | <1 | <1±0 | 3 | 1 | 2±1.41 |
| QSP5 | 1 | 3 | 2±1.41 | <1 | <1 | <1±0 | 10 | 1 | 5.5±6.36 |
| QSR0.5 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | 1 | 0.5±0.71 |
| QSR2 | <1 | <1 | <1±0 | <1 | <1 | <1±0 | 1 | 1 | 1±0 |
| QSR5 | <1 | 1 | 0.5±0.71 | <1 | <1 | <1±0 | 2 | 1 | 1.5±0.71 |

Se observa que al agregar los extractos, en la mayoría de los casos mejora de manera notable la tolerancia a los microorganismos ambientales respecto al blanco (sin importar en estas pruebas el tipo de extracto utilizado). Y se deduce que no es necesario un

proceso de esterilización previa, como suele suceder con los plásticos tradicionales [88]. En la tabla 3.2 se observa que la mayoría de las películas muestran niveles bajos y aceptables de contaminación previa, lo cual indica que los extractos dan a los materiales mejores propiedades antimicrobianas a las películas de quitosano-almidón [57-59].

3.2.3 Pruebas antimicrobianas contra mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos.

Se realizaron pruebas antimicrobianas para comprobar la eficacia de las películas en presencia de hongos, coliformes totales y mesofílicos aerobios utilizando el método para hongos, el método para coliformes totales y el método estándar para mesofílicos aerobios. Estas pruebas son muy importantes ya que la presencia de microorganismos es la primera causa de la descomposición de los alimentos. Los resultados obtenidos al finalizar el periodo de cultivo de los diversos microorganismos se muestran en las figuras 3.15-3.17, así como en la tabla 3.3.

Se define como alta actividad antimicrobiana, cuando la mayoría de las películas con cierto extracto no presentan crecimiento de algún microorganismo, así como si existe una inhibición en los alrededores. Una nula actividad antimicrobiana ocurre cuando se presenta crecimiento de algún microorganismo sobre las películas (figura 3.14).

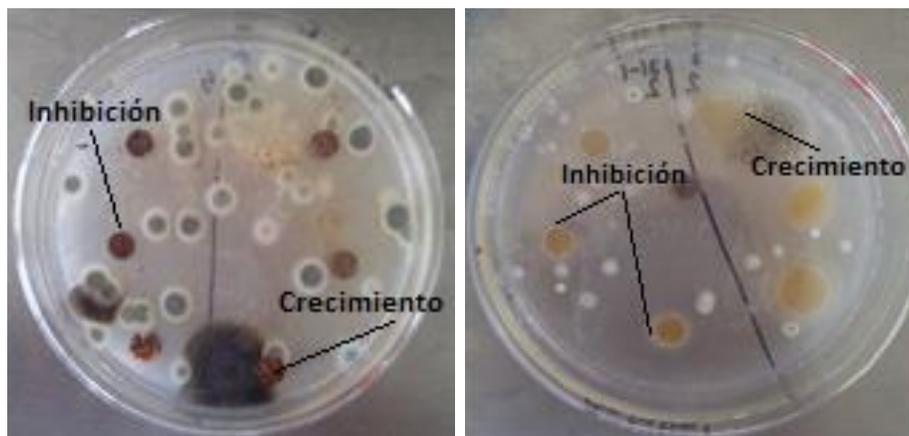


Figura 3.14 Zonas de crecimiento e inhibición de microorganismos en la caja petri.

3.2.3.1 Actividad contra mesofílicos aerobios

En la figura 3.15, se muestra el crecimiento de colonias de mesofílicos aerobios sobre el agar para métodos estándar, en cuya superficie se encuentran los discos de las películas de quitosano-almidón, a lo largo de 2 días de incubación a temperatura ambiente. Se observa en diversa bibliografía que el quitosano en combinación con extractos naturales (orégano, menta, granada, etc.) inhibe el crecimiento de colonias bacterias mesofílicas aerobias [89-90].

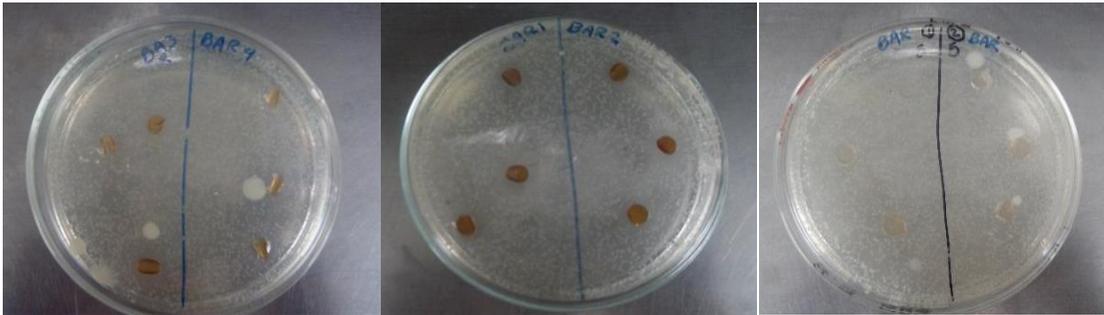
Observamos que las películas que obtienen los mejores resultados ante los mesofílicos aerobios son: QSA0.5, QSA2, QSA5, QSAm2, QSAm5, QSB0.5, QSB2, QSB5, QSG2, QSG5, QSO2, QSO5, QSP0.5 y QSR5. Para ver las causas a las que atribuimos el efecto antibacterial de las películas, ver sección 3.2.3.4. En la tabla 3.3 se indican los resultados de la actividad antimicrobiana de las películas sobre estos microorganismos.

Observamos comportamientos similares a los obtenidos por Duran y col. (2016), quienes mejoraron la inhibición de mesofílicos aerobios adicionando natamicina, nisina, extracto de semilla de uva y extracto de granada a soluciones de quitosano [91].

Un resultado similar se obtuvo en la investigación de Yuan y col. (2013), quienes redujeron la presencia de bacterias aerobias en camarón almacenado mediante la adición de extracto de cáscara de granada a solución de quitosano [92].

También se observó este comportamiento en el estudio de Paparella y col. (2016), quienes mejoraron la actividad antilisterial usando una mezcla de quitosano y aceite esencial de orégano [93].

Crecimiento en 24 horas



Crecimiento en 48 horas



Figura 3.15 Observación de crecimiento de mesofílicos aerobios en 24 y 48 horas.

3.2.3.2 Actividad contra coliformes totales

En la figura 3.16, se muestra el crecimiento de colonias de coliformes sobre el agar violeta bilis brillante, en cuya superficie se encuentran los discos de las películas de quitosano-almidón, a lo largo de 2 días de incubación a 37 °C. De acuerdo a las investigaciones de Shen y col. (2010), la adición de un 5% o más de quitosano o de un 15% de sorbato de potasio en películas de almidón de papa dulce inhibe el crecimiento de colonias de *E. coli* [94], así como Pranoto y col. (2005) estipulan que el quitosano en combinación con aceite de ajo reduce el crecimiento de *E. coli*, que es la bacteria representativa del grupo de coliformes totales [95]. Se observa que las películas que obtienen los mejores resultados ante los coliformes totales son: QSA0.5, QSA2, QSA5, QSAm5, QSG5, QSO2, QSO5, QSR0.5 y QSR5. Para conocer los mecanismos

antibacteriales propuestos para las películas utilizadas en esta investigación, ver sección 3.2.3.4. En la tabla 3.3 se indican los resultados de la actividad antimicrobiana de las películas sobre estos microorganismos.

Crecimiento en 24 horas



Crecimiento en 48 horas

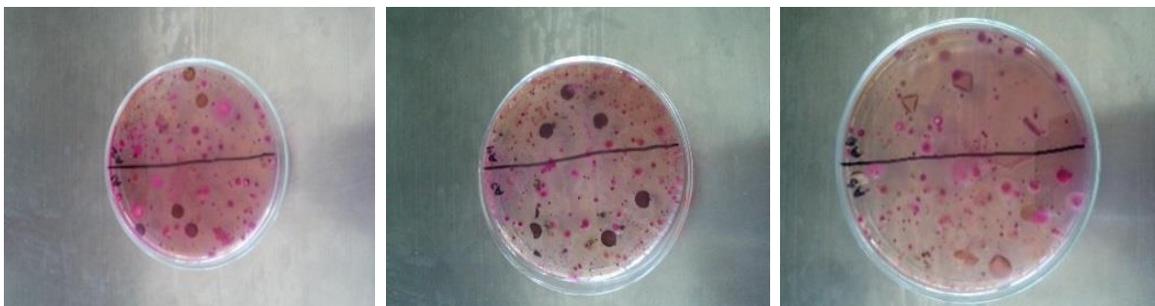


Figura 3.16 Observación de crecimiento de coliformes en 24 y 48 horas.

3.2.3.3 Actividad contra hongos

En la figura 3.17, se muestra el crecimiento de colonias de *P. notatum* sobre el agar dextrosa-papa, en cuya superficie se encuentran los discos de las películas de quitosano-almidón, a lo largo de 5 días de incubación a 25 °C. También se observó el crecimiento de dos especies de hongos conocidas como *A. niger* y *A. fumigatus*, esto se debe a una contaminación del medio provocada por la presencia en el ambiente de las especies antes mencionadas. Se observa en distintas investigaciones, tales como las de Martínez-Camacho y col. (2010), Plascencia-Jatomea y col. (2003), y Ture y col. (2011) que el quitosano no inhibe al 100% las colonias de hongos, confirmando que el quitosano es un agente fungistático más que fungicida. No se ha observado que exista una mejora en la actividad

fungicida respecto al % de deacetilación. También se ha observado que el quitosano de peso molecular medio es un excelente agente fungistático [96-98]. Observamos que las películas que obtienen los mejores resultados ante los tres tipos de hongos son: QSA5, QSAm2, QSAm5, QSB0.5, QSB2, QSB5, QSO5 y QSP0.5. Para mayor información sobre los mecanismos fungistáticos/fungicidas de las películas, ver sección 3.2.3.4. En la tabla 3.3 se indican los resultados de la actividad antimicrobiana de las películas sobre estos microorganismos.

Crecimiento en 24 horas



Crecimiento en 120 horas



Figura 3.17 Observación de crecimiento de hongos en 24 y 120 horas.

Tabla 3.3 Resultados de Pruebas Antimicrobianas.

| Película | Mesofílicos aerobios | | Coliformes totales | | Hongos | |
|----------|----------------------|------------------------|--------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| | Pruebas aprobadas | Zona de inhibición, mm | Pruebas aprobadas | Zona de inhibición, mm | Pruebas aprobadas | Zona de inhibición, mm |
| QS2 | 0/6 | 0±0 | 1/6 | 2±0.89 | 2/6 | 1.333±0.52 |
| QSA0.5 | 5/6 | 2.333±0.52 | 4/6 | 2.333±0.52 | 3/6 | 1.333±0.52 |

| | | | | | | |
|---------|-----|------------|-----|------------|-----|------------|
| QSA2 | 5/6 | 2.5±0.55 | 4/6 | 2.5±0.55 | 3/6 | 3.5±1.22 |
| QSA5 | 4/6 | 2.5±0.55 | 5/6 | 2.5±0.55 | 5/6 | 8±2.76 |
| QSAm0.5 | 2/6 | 3.667±0.52 | 4/6 | 1.5±0.55 | 1/6 | 6.167±2.40 |
| QSAm2 | 4/6 | 9.333±1.03 | 3/6 | 3.333±0.52 | 4/6 | 6.5±2.35 |
| QSAm5 | 4/6 | 9.5±0.84 | 4/6 | 3.5±0.55 | 4/6 | 7±2.76 |
| QSB0.5 | 4/6 | 1.167±0.41 | 1/6 | 2.667±0.82 | 4/6 | 7±2.76 |
| QSB2 | 4/6 | 1.333±0.52 | 1/6 | 2.833±0.98 | 5/6 | 7.333±2.58 |
| QSB5 | 4/6 | 2.5±0.55 | 1/6 | 3±0.89 | 5/6 | 7.5±2.59 |
| QSG0.5 | 2/6 | 2.333±0.82 | 1/6 | 1.833±0.75 | 2/6 | 7.333±2.58 |
| QSG2 | 5/6 | 4±0.89 | 3/6 | 2.167±0.75 | 0/6 | 7.333±2.58 |
| QSG5 | 6/6 | 4.167±0.98 | 4/6 | 2.167±0.75 | 1/6 | 7.667±2.58 |
| QSO0.5 | 3/6 | 4±0.89 | 2/6 | 1.5±0.55 | 2/6 | 1.5±0.55 |
| QSO2 | 5/6 | 4.167±0.75 | 4/6 | 1.5±0.55 | 3/6 | 1.667±0.52 |
| QSO5 | 6/6 | 4.167±0.98 | 4/6 | 2±0.63 | 4/6 | 1.667±0.52 |
| QSP0.5 | 5/6 | 4±0.89 | 1/6 | 1.833±0.41 | 4/6 | 1.833±0.41 |
| QSP2 | 3/6 | 3.5±0.84 | 1/6 | 1.333±0.52 | 3/6 | 1.333±0.52 |
| QSP5 | 1/6 | 3.333±0.82 | 2/6 | 1.333±0.52 | 0/6 | 1.333±0.52 |
| QSR0.5 | 2/6 | 1.833±0.98 | 5/6 | 6.5±2.35 | 3/6 | 2.5±0.84 |
| QSR2 | 3/6 | 1.833±0.75 | 2/6 | 7.167±2.79 | 3/6 | 6.833±2.93 |
| QSR5 | 4/6 | 2±0.89 | 4/6 | 8±2.76 | 3/6 | 7.167±2.78 |

Comparando los resultados de las pruebas previas y las pruebas antimicrobianas se encontró lo siguiente: la película QSP0.5 que no funcionó en una de las pruebas previas contra coliformes y sólo inhibió a estos en una de las seis pruebas antimicrobianas; y la película QSG2 no funcionó en una prueba previa contra hongos y sólo inhibió a éstos en una prueba antimicrobiana. Las otras películas que no pasaron una de las dos pruebas previas: QSA5 contra hongos, QSG2 contra mesofílicos aerobios, QSG5 contra mesofílicos aerobios y QSO5 contra mesofílicos aerobios y hongos, pasaron un gran porcentaje de las pruebas antimicrobianas posteriores.

3.2.3.4.- Mecanismos propuestos de actividad antimicrobiana de las películas.

A continuación se enuncian los mecanismos antimicrobianos del quitosano y extractos naturales propuestos por diversos investigadores:

Interacción entre el quitosano (positivo) y bacterias con membranas celulares negativas (Gramnegativas) altera las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo [99].

La formación del complejo polielectrolito bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrientes/desechos, provocando la muerte bacteriana [99].

La interacción electrostática entre los grupos NH_3^+ del polication y los grupos fosforilos de los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gramnegativas causa daños en ésta, provocando la salida de material intracelular [99].

Para algunas bacterias Grampositivas (como *S. aureus* y *Bacillus cereus*) se ha planteado la posibilidad de que la membrana celular de estos microorganismos tenga poros lo suficientemente grandes como para que el quitosano logre entrar al interior de las células y alterar funciones vitales de éstas [99].

La interacción con el ADN podría inhibir la replicación del ARN y la síntesis de proteínas. El efecto quelante podría disminuir la concentración de algunos metales necesarios en procesos enzimáticos. La interacción selectiva del quitosano con trazas de metales pudiera inhibir la producción de toxinas y el crecimiento microbiano. Los ácidos orgánicos de menor tamaño producen soluciones con mejores propiedades bactericidas [99].

Una vez que la membrana celular se ha dañado es posible el paso de compuesto orgánicos polares (como los antioxidantes) nocivos para las funciones básicas de la bacteria. La interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambian la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones [99].

También se produce la inhibición de la síntesis de algunas enzimas presentes en los hongos, las cuales son importantes para el desarrollo de actividades metabólicas. Se

presentaron alteraciones citológicas después del tratamiento con soluciones al 1.75% de quitosano [99].

Los ácidos fenólicos tienen efectos antimicrobianos dependientes del pH. Bajos valores de pH (atribuidos a los ácidos orgánicos) tienen un papel importante en la inhibición de patógenos (ver sección 3.4) [100].

El mecanismo de acción de timol es semejante al de carvacrol. El timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gramnegativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y presenta efecto bactericida contra microorganismos Gramnegativos y Grampositivos, provocando daño en la membrana celular y salida de los componentes intracelulares [101].

Se cree que los grupos polifenólicos altera la interacción de lípidos y proteínas, lo que ocasiona cambios en la capa fosfolipídica desestabilizando la membrana y ocasionando una mayor movilidad en su estructura [102].

3.3 Medición de espesor

Las películas tienen un aspecto homogéneo, y se pueden retirar fácilmente de la bandeja de poliestireno (con la excepción de QSP5, porque es pegajosa). Las muestras presentan diferentes coloraciones debido a la presencia de diferentes extractos. Se observó que la adición de antioxidantes naturales incrementó el espesor promedio de las películas (con excepción de QSB0.5, marcada en negritas en la tabla 3.4). En algunos casos, a mayor concentración de extracto mayor el espesor de la película.

Se observó un comportamiento similar al observado por Benavides y col. (2012), que indicó que la adición de aceite esencial de orégano producía películas de alginato bactericidas significativamente más gruesas (0.031-0.038 mm) [103].

Utilizamos concentraciones de extracto más altas que en la investigación de Kanatt y col. (2012) para probar que los extractos acuosos pueden aumentar el espesor de la película [62].

De acuerdo con Qin y col. (2015), el espesor de las películas de quitosano / montmorillonita aumentó con la adición de extracto de corteza de granada, debido a sus compuestos polifenólicos de alto peso molecular. Las películas se prepararon usando la misma cantidad de solución de quitosano; Las diferencias entre las películas fueron las cantidades de montmorillonita y extracto de cáscara de granada. Sin embargo, los autores indicaron que el aumento del espesor de la película se relaciona sólo con el incremento del extracto de granada [104].

Nuestras muestras muestran un comportamiento similar al de Espitia y col. (2014) en su investigación, encontraron que la presencia de polifenoles de cáscara de manzana y compuestos de aceite esencial de tomillo aumentó el espesor de la película de control [105]. En nuestra investigación, las películas se prepararon y almacenaron en una habitación con temperatura controlada y las cantidades de cada compuesto de películas se midieron cuidadosamente con el fin de reducir los factores que influyen en el incremento del espesor. En nuestra investigación el incremento de espesor se puede atribuir a la presencia de antioxidantes naturales y la variación del contenido de agua en la solución de almidón.

La tabla 3.4 indica el espesor medio de la película de cada muestra. Se observó que la adición de extractos aumentó el espesor promedio de la película (excepto QSB0.5). En algunos casos, cuantas más altas son las concentraciones del extracto, más gruesa es la película (especialmente para el arándano rojo, el arándano morado y el betabel). El aumento de espesor podría ser debido a la presencia en el extracto de compuestos tales como polisacáridos, ácidos carboxílicos, antioxidantes, etc., creando una matriz más compleja. El aumento del espesor fue confirmado por la mejora de las propiedades ópticas y la disminución del módulo de almacenamiento (ambos hechos están relacionados con el grosor de la película). Se observa que las películas con mayor espesor corresponden a las que mejor actividad antimicrobiana tienen (ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3). También se

establece que las películas con mayor espesor obtienen una mejora en las propiedades ópticas, ver sección 3.5.

Tabla 3.4 Espesor promedio de las películas.

| Película | Espesor promedio, mm | Película | Espesor promedio, mm |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| QS2 | 0.164±0.013 | QSG2 | 0.226±0.009 |
| QSA0.5 | 0.194±0.011 | QSG5 | 0.254±0.025 |
| QSA2 | 0.214±0.019 | QSO0.5 | 0.190±0.01 |
| QSA5 | 0.238±0.013 | QSO2 | 0.202±0.013 |
| QSAm0. | 0.212±0.015 | QSO5 | 0.194±0.005 |
| QSAm2 | 0.244±0.017 | QSP0.5 | 0.266±0.021 |
| QSAm5 | 0.248±0.043 | QSP2 | 0.216±0.011 |
| QSB0.5 | 0.154±0.005 | QSP5 | 0.272±0.033 |
| QSB2 | 0.162±0.018 | QSR0.5 | 0.184±0.011 |
| QSB5 | 0.226±0.015 | QSR2 | 0.174±0.005 |
| QSG0.5 | 0.236±0.011 | QSR5 | 0.238±0.011 |

Precisión del micrómetro= 0.01 mm

3.4 Densidad aparente

Los resultados de densidad aparente se indican en la tabla 3.5. Los cambios en este parámetro están relacionados con la porosidad y capacidad de filtración de la película. Un bajo valor de densidad aparente significa que los materiales poseen mucha porosidad, y capacidad de filtración [107].

Se observó que la adición de arándano rojo y arándano morado a las películas de quitosano- almidón conduce a un aumento en los valores de densidad. En el caso de la adición de betabel, granada, orégano, pitaya y resveratrol (excepto QSB0.5, QSG0.5 y QSG5), observamos una disminución en estos valores. Se deduce de acuerdo con los resultados que la adición de extractos naturales produce películas más porosas (en la mayoría de los casos) que QS2. La permeabilidad del material (transmisión de un fluido, como el vapor de agua y el oxígeno) está directamente relacionada con la porosidad del mismo [108].

Las películas con mayores valores de densidad aparente mostraron una mejor actividad antimicrobiana, como resultado de obtener una mejor barrera ante el oxígeno y una disminución de la transferencia de humedad (debido a su menor porosidad). Los

microorganismos necesitan estos compuestos para sobrevivir, si son aislados de estos componentes, no pueden crecer correctamente [62].

Tabla 3.5 Densidad aparente de las películas.

| Película | Densidad aparente (gm/cm³) | Película | Densidad aparente (gm/cm³) |
|-----------------|--|-----------------|--|
| QS2 | 0.0835±0.0001 | QSG2 | 0.0713±0.0002 |
| QSA0.5 | 0.1034±0.00004 | QSG5 | 0.1087±0.0002 |
| QSA2 | 0.0933±0.00035 | QSO0.5 | 0.0757±0.0002 |
| QSA5 | 0.1051±0.000055 | QSO2 | 0.0677±0.00007 |
| QSAm0.5 | 0.0908±0.00031 | QSO5 | 0.0641±0.0002 |
| QSAm2 | 0.0916±0.0009 | QSP0.5 | 0.0711±0.0001 |
| QSAm5 | 0.0847±0.00044 | QSP2 | 0.0752±0.00004 |
| QSB0.5 | 0.0907±0.0005 | QSP5 | 0.0646±0.0002 |
| QSB2 | 0.0754±0.00039 | QSR0.5 | 0.0649±0.00007 |
| QSB5 | 0.0814±0.00039 | QSR2 | 0.0816±0.00003 |
| QSG0.5 | 0.0984±0.00026 | QSR5 | 0.0807±0.00009 |

3.5 Medición de potencial de hidrógeno (pH).

En las tablas 3.6-3.8 se muestran los valores de pH obtenidos para las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales. La medición del pH es importante ya que es necesario obtener películas con valores de pH menores de 7, ya que el quitosano y los antioxidantes ven potenciadas sus propiedades antimicrobianas en medios ácidos. Consideraremos la siguiente información: las antocianinas son más estables en medio ácido [30]; las betalaínas tienen su máxima estabilidad entre pH 5 y 6 [31]; el resveratrol es estable a pH ácido [108]. En negritas se seleccionan los extractos de las películas que obtuvieron mejores resultados antimicrobianos, esto coincide con los extractos con el pH más bajo, aquellos que poseen antocianinas y betalaínas. En la tabla 3.6 se muestran los valores de pH promedio de cada componente de las películas.

Tabla 3.6 Valores de pH de los componentes de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales.

| Solución | pH |
|-------------------------|------------|
| Ácido acético al 1% | 2.60±0.028 |
| Quitosano al 2% | 4.46±0 |
| Almidón al 2% | 5.82±0.014 |
| Extracto de arándano | 2.86±0.028 |
| Extracto de arándano | 3.29±0.014 |
| Extracto de betabel | 4.31±0.014 |
| Extracto de granada | 3.11±0.014 |
| Extracto de orégano | 5.24±0 |
| Extracto de pitaya | 5.14±0.014 |
| Extracto de resveratrol | 4.93±0.014 |

En la tabla 3.7 se indican con negritas las películas que dieron mejores resultados contra el amplio grupo de microorganismos probados, de nuevo se observa que las películas más efectivas son aquellas que en el momento de su síntesis tienen pH más ácidos. Esto se puede adjudicar al hecho de que en medio ácido las antocianinas, betalaínas y otros antioxidantes son más estables si se encuentran en medios básicos, también el quitosano puede interactuar mejor con estos compuestos en un ambiente ácido [6] [30-31] [108].

Tabla 3.7 Valores de pH de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales después de su síntesis (día 1).

| Muestra | Día 1 | |
|----------------|--------------------|------------------------|
| | pH promedio | Tiras reactivas |
| QS2 | 4.57±0.007 | 4-5 |
| QSA0.5 | 4.73±0.007 | 4-5 |
| QSA2 | 4.70±0.007 | 4-5 |
| QSA5 | 4.68±0.014 | 4-5 |
| QSAm0.5 | 4.11±0.007 | 4-5 |
| QSAm2 | 4.07±0.007 | 4-5 |
| QSAm5 | 4.02±0.007 | 4-5 |
| QSB0.5 | 4.83±0.007 | 4-5 |
| QSB2 | 4.78±0.007 | 4-5 |

| | | |
|--------|------------|------------|
| QSB5 | 4.62±0.014 | 4-5 |
| QSG0.5 | 4.52±0.021 | 4-5 |
| QSG2 | 4.41±0 | 4-5 |
| QSG5 | 4.31±0.014 | 4-5 |
| QSO0.5 | 4.81±0.007 | 4-5 |
| QSO2 | 4.77±0.014 | 4-5 |
| QSO5 | 4.62±0.014 | 4-5 |
| QSP0.5 | 4.01±0.007 | 4 |
| QSP2 | 4.04±0.014 | 4 |
| QSP5 | 4.09±0.014 | 4 |
| QSR0.5 | 4.65±0.007 | 4-5 |
| QSR2 | 4.62±0.007 | 4-5 |
| QSR5 | 4.59±0.007 | 4-5 |

En la tabla 3.8 se muestran los valores de pH de las películas al día 15 (que es el momento donde se encuentran listas) y se observa que existe un aumento de los valores de pH, esto puede adjudicarse a la evaporación del solvente del quitosano (ácido acético) durante el período de secado, la película QS2 tiene un pH menor debido a la presencia de este solvente, se cree que en las películas con antioxidantes naturales el pH es mayor debido a que los extractos contienen agua y diversas sustancias tales como azúcares, etc.

Esta prueba también puede ser una confirmación de la presencia de los antioxidantes debido a lo siguiente: A pH 1, el catión flavilio (de color rojo) es la especie predominante y contribuye a los colores morados y rojos. A valores de pH entre 2 y 4 las especies quinodales azules son predominantes. A valores de pH entre 5 y 6 sólo dos especies incoloras pueden ser observadas, las cuales son pseudobase carbinol y una chalcona. A valores mayores que 7, las antocianinas son degradadas dependiendo de sus grupos sustituyentes. A valores de pH entre 4 y 6 (los cuales son de nuestro interés) las cuatro formas estructurales de las antocianinas coexisten, por ello puede observarse coloraciones en las películas de arándano rojo, betabel y granada. Aunque existe una degradación del color por la presencia de la luz. [109-110].

Las betalaínas son relativamente estables en un rango de pH de 3 a 7, lo cual las hace propicias para aplicaciones en mezclas o alimentos de baja acidez [71]. El rango óptimo para la estabilidad de las betalaínas es 5-6 [72-75].

De nueva cuenta, se comprueba que las películas con menor valor de pH presentan los mejores resultados antimicrobianos (marcados en negritas en tabla 3.8). Esto se puede adjudicar a la mayor estabilidad de las antocianinas, betalaínas y otros antioxidantes en medio ácidos y la mejor interacción del quitosano con estos compuestos en un ambiente ácido. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

Tabla 3.8 Valores de pH de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales listas para su uso (día 15).

| Muestra | Día 15 | |
|---------|-------------|-----------------|
| | pH promedio | Tiras reactivas |
| QS2 | 5.29±0.021 | 5-6 |
| QSA0.5 | 5.86±0.014 | 5-6 |
| QSA2 | 5.54±0.007 | 5-6 |
| QSA5 | 5.33±0.028 | 5-6 |
| QSAm0.5 | 4.58±0.014 | 4-5 |
| QSAm2 | 4.47±0.028 | 4-5 |
| QSAm5 | 4.34±0.007 | 4-5 |
| QSB0.5 | 5.88±0.007 | 5-6 |
| QSB2 | 5.60±0.028 | 5-6 |
| QSB5 | 5.59±0.007 | 5-6 |
| QSG0.5 | 6.14±0.014 | 6 |
| QSG2 | 6.02±0.035 | 6 |
| QSG5 | 5.97±0.007 | 6 |
| QSO0.5 | 5.89±0.014 | 5-6 |
| QSO2 | 5.58±0.035 | 5-6 |
| QSO5 | 5.52±0.007 | 5-6 |
| QSP0.5 | 5.26±0.007 | 5-6 |
| QSP2 | 5.46±0.014 | 5-6 |
| QSP5 | 4.83±0.014 | 4-5 |
| QSR0.5 | 5.92±0.021 | 6 |

| | | |
|------|------------|------------|
| QSR2 | 5.88±0.007 | 5-6 |
| QSR5 | 5.77±0.028 | 5-6 |

El ácido acético no tuvo un papel relevante en la actividad antimicrobiana, ya que no era una variable experimental: todas las películas incluyendo la película de control QS2 contenían la misma cantidad de ácido acético diluido y observamos que QS2 tenía una actividad antimicrobiana menor que las películas con extractos. El mismo comportamiento se observó en la investigación de Gupta et al. (2011) y Moreira et al. (2015), que prepararon soluciones de quitosano usando solución de ácido acético al 1% en todas sus muestras. Llegaron a la conclusión de que la adición de compuestos como poli (acrilamida)/ZnS y caseinato de sodio mejora la actividad antimicrobiana de quitosano, no la presencia de ácido acético [111-112]. También, el incremento de pH entre el día 1 y el 15 se puede atribuir a la volatilización parcial de disolventes tales como agua y ácido acético.

El análisis de varianza (ANOVA) multifactorial proporcionó evidencia estadística sobre el efecto del antioxidante, su concentración y el día de medición a los valores de pH. Si el valor de p calculado de un factor determinado es menor que el nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula de que no hay diferencia entre los medios, o ninguna interacción entre los factores, como se muestra en la tabla 3.9.

Debido a que las tres variables independientes resultaron producir al menos una diferencia significativa en el pH medio, se empleó una prueba post hoc (método de Tukey con intervalos de confianza del 95%) para explorar qué niveles de los tres factores podrían considerarse las fuentes de esas diferencias. Por ejemplo, el análisis estadístico nos permitió encontrar que el pH no difiere significativamente entre las muestras que contienen resveratrol, granada, betabel, orégano y arándano rojo (medias de 5.24, 5.23, 5.22, 5.19 y 5.14, respectivamente, calculadas considerando sólo el antioxidante o AOX como causa de variación, según el método de Tukey); sin embargo, se detectó una diferencia importante en los valores de pH promedio como resultado de la incorporación de pitaya y arándano morado (medias de 4.61 y 4.26, respectivamente). Además, la prueba reveló que el pH promedio no cambia significativamente entre las concentraciones de 0.5% y 2% de antioxidante (medias de 5.08 y 4.99, respectivamente), ni entre las concentraciones del 2%

y 5% (4.99 y 4.88, respectivamente); sin embargo, al nivel de confianza de la prueba de Tukey, se produjo un cambio representativo en el pH promedio entre las concentraciones de 0.5% y 5% (5.08 y 4.88, respectivamente). También se concluyó que el día en el que el pH de la película se mide tiene un efecto importante sobre el valor promedio (medias de 5.49 para el día 1 y 4.47 para el día 15), lo que se atribuye a la evaporación de disolventes durante el período de secado después del procedimiento de síntesis.

La posible interacción combinada de los factores experimentales se estudió de manera correspondiente para demostrar qué efectos eran dependientes entre sí. El análisis mostró que sólo dos interacciones conjuntas (AOX-día y AOX-%•AOX-día) indujeron diferencias significativas entre los resultados de pH promedio. También se puede observar en la figura 3.18 el efecto del extracto de concentración, el tipo de antioxidante y el día de medición sobre los valores de pH de las películas.

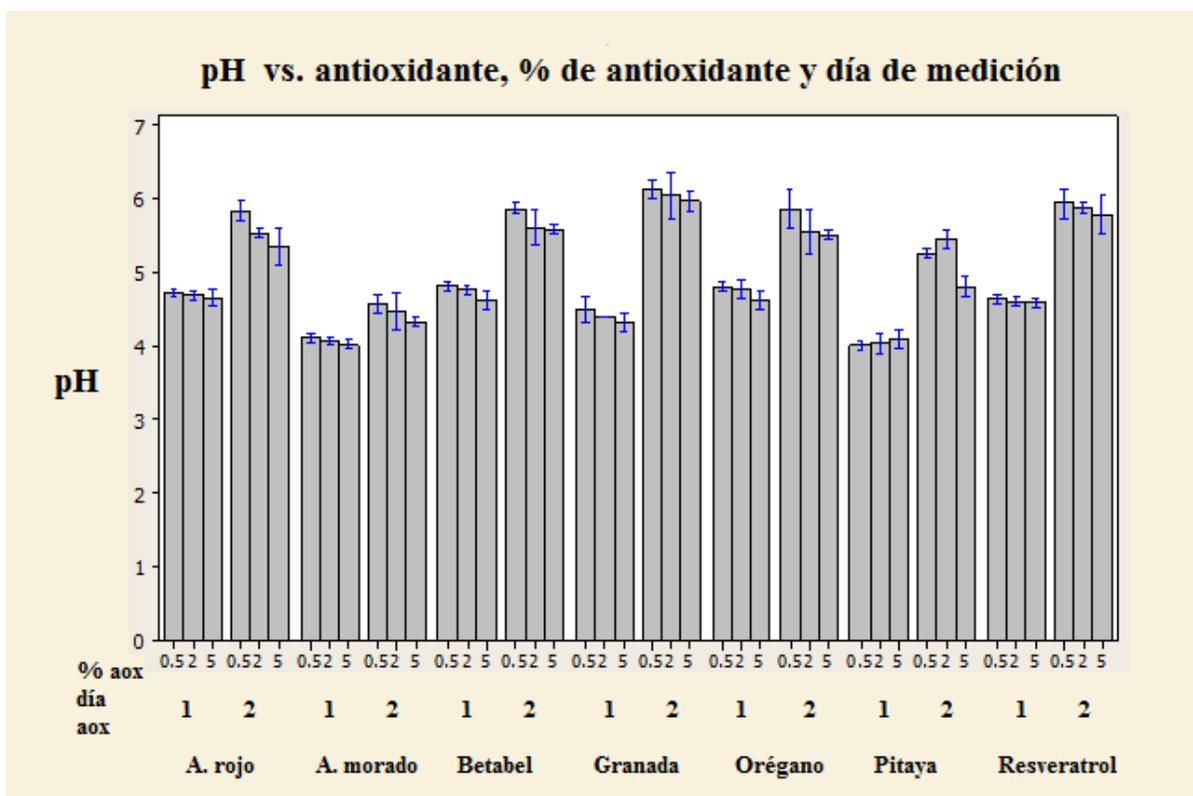


Figura 3.18 Efecto de concentración del extracto, del tipo de antioxidante y del día de medición sobre los valores de pH de las películas. Cada punto de datos representa la media \pm DE; * ANOVA, prueba de Tukey, $p < 0,05$.

Tabla 3.9. Interpretación de ANOVA multifactorial.

| Factor | Valor de p | Implicación estadística | Conclusión |
|------------------|--------------------------------|--|--|
| AOX | <0.0005 | Rechaza la hipótesis nula de no diferencia en los pH promedios. | Al menos un pH promedio es significativamente diferente del resto debido al tipo de antioxidante que se incorporan en la película. |
| % AOX | 0.002 | Rechaza la hipótesis nula de no diferencia en los pH promedios. | Al menos un pH promedio es significativamente diferente del resto debido al contenido de antioxidante (% peso) en la película. |
| Día | <0.0005 | Rechaza la hipótesis nula de no diferencia en los pH promedios. | El pH promedio medido en el día 1 es significativamente diferente del medido en el día 15. |
| AOX y % AOX | 0.991 | No rechaza la hipótesis nula de no interacción entre los factores. | El efecto del tipo de antioxidante en el pH promedio no depende significativamente de su contenido (% peso). |
| AOX y día | <0.0005 | Rechaza la hipótesis nula de no interacción entre los factores | El efecto del tipo de antioxidante sobre el pH promedio depende significativamente del día en el que el pH fue medido. |
| % AOX y día | 0.175 | No rechaza la hipótesis nula de no interacción entre los factores. | El efecto del contenido de antioxidante (% peso) sobre el pH promedio no depende significativamente del día en el que el pH es medido. |
| AOX, % AOX y día | <0.0005 | Rechaza la hipótesis nula de no interacción entre los factores | Existe un efecto significativo de la combinación de los tres factores sobre los valores de pH promedio. |

AOX: antioxidante; %p: por ciento peso.

3.6 Propiedades ópticas (transparencia y opacidad)

Se observó con base en los resultados obtenidos durante estas pruebas que la adición de extractos mejora las propiedades de barrera de luz ultravioleta (con excepción de QSR2 marcado en negritas en la tabla 3.10). Utilizando UV-Vis a 400 nm se observó que los extractos dan valores menores de % transmitancia, lo que indica mejores propiedades de barrera de luz (con excepción de QSR5 marcado en negritas).

Las películas presentan menor valor de transparencia (con excepción de QSB0.5 marcado en negritas en la tabla 3.10) en comparación de QS2. En la mayoría de los casos, a mayor concentración de extractos menor transparencia. Se observó que la adición de extractos disminuye el valor de opacidad (con excepción de QSO2 marcado en negritas) en comparación de QS2. Esto indica que la adición de extractos naturales mejora las propiedades de barrera de luz, lo que permitiría una mejor conservación de los alimentos evitando algunos fenómenos de descomposición tales como la rancidez lipídica. Estos resultados nos indican que es efectivo contra la segunda causa de la descomposición de los alimentos: la degradación de los lípidos.

Se observan resultados similares a los obtenidos por Kanatt y col. (2012), una mejora de las propiedades ópticas, que trabajaron con películas de quitosano-alcohol polivinílico con extracto acuoso de menta y granada, a pesar de que ellos no presentaron aumento en los valores de espesor [62]. Se observa que las películas con mayor espesor presentan una reducción significativa en los valores de transparencia y % Transmitancia, así como un aumento de la opacidad y una mejor actividad antimicrobiana, ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3 y 3.4. Todos los resultados se presentan en la tabla 3.10. También observamos que la película QS2 es más cristalina y tiene menor espesor que las películas con extractos. Para más detalles acerca de la cristalinidad de los materiales, ver sección 3.10.1.

Tabla 3.10 Valores de %Transmitancia a 280 nm y 400 nm, transparencia y opacidad de las películas.

| Película | %T a 280 nm | % T a 400 nm | Transparencia | Opacidad |
|-----------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| QS2 | 10.2442±0.71 | 30.8092±2.34 | 9.74382±0.19 | 0.07681±0.01 |
| QSA0.5 | 0.0866±0.070 | 3.94262±1.78 | 7.03310±0.52 | 0.12132±0.0017 |
| QSA2 | 0.9668±0.39 | 11.7966±1.54 | 6.61022±0.19 | 0.11328±0.0084 |
| QSA5 | 0.5295±0.12 | 16.8562±1.90 | 6.50092±0.20 | 0.11983±0.0074 |
| QSAm0. | 1.0697±0.33 | 16.5411±1.85 | 6.98136±0.21 | 0.13173±0.02 |
| QSAm2 | 0.2182±0.18 | 8.8739±1.33 | 5.59052±0.09 | 0.20691±0.01 |
| QSAm5 | 0.3032±0.15 | 7.9730±0.82 | 5.39832±0.26 | 0.21030±0.02 |
| QSB0.5 | 2.0982±0.78 | 25.4562±3.24 | 10.3050±0.27 | 0.07983±0.02 |
| QSB2 | 0.2811±0.13 | 11.4734±2.14 | 9.34763±0.24 | 0.11238±0.01 |
| QSB5 | 0.0566±0.05 | 1.1172±0.22 | 4.80696±0.29 | 0.33784±0.02 |
| QSG0.5 | 0.4638±0.15 | 12.8224±0.54 | 6.37701±0.07 | 0.13510±0.01 |

| | | | | |
|--------|---------------------|---------------------|--------------|-----------------------|
| QSG2 | 0.9107±0.22 | 17.0909±1.57 | 6.8277±0.051 | 0.13645±0.01 |
| QSG5 | 0.1769±0.23 | 1.6192±0.82 | 5.18060±0.67 | 0.25293±0.01 |
| QSO0.5 | 2.0135±0.47 | 17.5357±2.39 | 7.83758±0.25 | 0.08531±0.0039 |
| QSO2 | 0.4690±0.18 | 19.3792±1.36 | 8.50917±0.13 | 0.07273±0.0058 |
| QSO5 | 0.2167±0.29 | 5.6792±1.50 | 8.21114±0.08 | 0.10168±0.0064 |
| QSP0.5 | 0.2437±0.40 | 3.2979±0.40 | 5.9859±0.18 | 0.17956±0.02 |
| QSP2 | 0.0272±0.029 | 0.1323±0.10 | 6.7034±0.52 | 0.20245±0.02 |
| QSP5 | 0.1623±0.10 | 0.1195±0.12 | 4.0516±0.38 | 0.55747±0.07 |
| QSR0.5 | 8.7779±2.05 | 27.2905±3.38 | 8.4157±0.25 | 0.09657±0.0077 |
| QSR2 | 10.9962±4.31 | 26.4296±9.05 | 6.6499±0.81 | 0.09698±0.02 |
| QSR5 | 4.7594±0.22 | 31.5367±3.17 | 7.0720±0.16 | 0.09806±0.01 |

3.7 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En las tablas 3.11 se muestran las bandas características de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales. En las figuras 3.19-3.21 se muestran los espectros de las películas en comparativo con QS2.

Las bandas características de estas películas se presentan, aproximadamente: a 3420 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos $-\text{OH}$ del quitosano y el almidón; otra a 3330 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo $-\text{NH}$, característico del quitosano; alrededor de los 2950 y 2920 cm^{-1} se observan bandas debidas al estiramiento del grupo C-H; en 1660 cm^{-1} se observa el estiramiento C=O; en 1575 cm^{-1} se presenta la flexión del grupo N-H de las aminas primarias; a 1360 cm^{-1} el estiramiento C-N del grupo amida III del quitosano; en 1160 cm^{-1} se observa el enlace glucosídico C-O-C; en 1080 cm^{-1} el estiramiento C-O; y el estiramiento del grupo C-O-C a 1000 cm^{-1} . De acuerdo a diversos autores, el peso molecular del quitosano no presenta una influencia sobre las bandas de absorción de las películas. Entre 900 cm^{-1} y 600 cm^{-1} se presentan picos muy pequeños que pueden deberse a enlaces C-H y C=C. Para conocer el número de onda correspondiente a cada banda característica de las películas, ver tabla 3.11.

Se considera que la banda a 3420 cm^{-1} , aproximadamente, en todos los espectros es ancha debido a la complejidad de la mezcla de la película, es decir, se tiene múltiples compuestos que contienen enlaces - OH. Se observa que la banda a 1575 cm^{-1} tiene una

intensidad mayor que en la banda en 1660 cm^{-1} , esto es debido a la deacetilación de la quitina e indica la prevalencia de grupos NH_2 . De acuerdo a diversos autores, el peso molecular del quitosano no presenta una influencia sobre las bandas de absorción de las películas [113-117].

Se observó que en el caso de películas con extractos naturales, los picos característicos se han desplazado a frecuencias más bajas en comparación con QS2. Esto se puede atribuir a cualquier interacción entre los grupos funcionales de quitosano, almidón, glicerol y extractos naturales (antioxidantes). Se observó la misma conclusión en la investigación de Qin y col. [104].

El decremento del % de transmitancia en películas con extractos naturales podría estar relacionado con la disminución de la transparencia y el incremento de la opacidad mostrados durante las pruebas de propiedades ópticas (ver sección 3.5). La adición de extractos naturales dio películas de color más intenso que implica estos cambios. No se observaron hay diferencias importantes entre nuestros espectros y sus picos característicos en comparación con los obtenidos por los investigadores referidos. Las películas con extractos naturales presentaron una banda más ancha a $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ en comparación con QS2, lo que implica la presencia de extractos naturales compuestos con enlaces -OH tales como agua, sacáridos, ácidos carboxílicos, antioxidantes, etc.

Tabla 3.11 Bandas características de absorción FTIR de las películas.

| Película | Estiramiento -OH | Estiramiento -NH | Estiramiento -CH | Estiramiento C=O | Deformación de -NH amina primaria | Estiramiento C-N de amina III | Enlace glucosídico C-O-C | Estiramiento C-O | Estiramiento C-O-C | Enlaces C-H y C=C |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|
| QS2 | 3420 | 3330 | 2950 | 1660 | 1580 | 1360 | 1160 | 1080 | 1000 | 900-600 |
| QSA0.5 | 3425 | 3333 | 2920 | 1654 | 1578 | 1370 | 1153 | 1098 | 1030 | 900-600 |
| QSA2 | 3404 | 3341 | 2920 | 1652 | 1573 | 1370 | 1155 | 1082 | 970 | 900-600 |
| QSA5 | 3395 | 3324 | 2920 | 1655 | 1574 | 1370 | 1155 | 1095 | 1030 | 900-600 |
| QSAm0.5 | 3400 | 3335 | 2915 | 1676 | 1572 | 1340 | 1165 | 1085 | 1010 | 900-600 |
| QSAm2 | 3410 | 3335 | 2915 | 1676 | 1572 | 1340 | 1165 | 1085 | 1010 | 900-600 |
| QSAm5 | 3397 | 3327 | 2915 | 1653 | 1578 | 1340 | 1154 | 1080 | 1027 | 900-600 |
| QSB0.5 | 3384 | 3334 | 2915 | 1659 | 1595 | 1370 | 1156 | 1060 | 1028 | 900-600 |
| QSB2 | 3384 | 3334 | 2915 | 1659 | 1595 | 1370 | 1156 | 1060 | 1028 | 900-600 |
| QSB5 | 3384 | 3334 | 2915 | 1659 | 1595 | 1370 | 1156 | 1060 | 1028 | 900-600 |
| QSG0.5 | 3420 | 3320 | 2910 | 1650 | 1586 | 1360 | 1156 | 1087 | 1034 | 900-600 |
| QSG2 | 3373 | 3318 | 2910 | 1650 | 1586 | 1360 | 1156 | 1087 | 1034 | 900-600 |
| QSG5 | 3373 | 3318 | 2910 | 1650 | 1586 | 1360 | 1156 | 1087 | 1034 | 900-600 |
| QSO0.5 | 3395 | 3322 | 2915 | 1659 | 1576 | 1365 | 1155 | 1080 | 1028 | 900-600 |
| QSO2 | 3407 | 3332 | 2915 | 1659 | 1576 | 1365 | 1155 | 1080 | 1028 | 900-600 |
| QSO5 | 3395 | 3332 | 2915 | 1659 | 1576 | 1365 | 1155 | 1080 | 1028 | 900-600 |
| QSP0.5 | 3370 | 3320 | 2920 | 1689 | 1618 | 1360 | 1118 | 1080 | 1040 | 900-600 |
| QSP2 | 3368 | 3313 | 2920 | 1665 | 1620 | 1360 | 1118 | 1080 | 1040 | 900-600 |
| QSP5 | 3384 | 3305 | 2920 | 1652 | 1618 | 1360 | 1118 | 1080 | 1040 | 900-600 |
| QSR0.5 | 3432 | 3331 | 2920 | 1654 | 1570 | 1350 | 1152 | 1081 | 1000 | 900-600 |
| QSR2 | 3432 | 3331 | 2920 | 1654 | 1570 | 1350 | 1152 | 1081 | 1000 | 900-600 |
| QSR5 | 3432 | 3331 | 2920 | 1654 | 1570 | 1350 | 1152 | 1081 | 1000 | 900-600 |

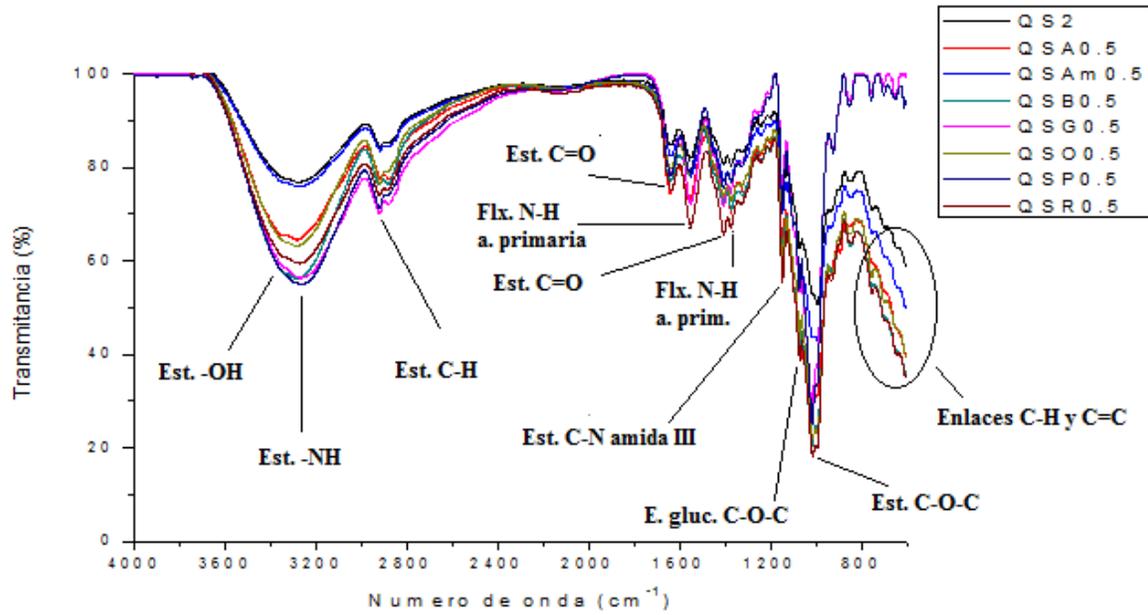


Figura 3.19 Espectro de FTIR comparativo de QS2 vs. Películas con 0.5% de extracto en peso.

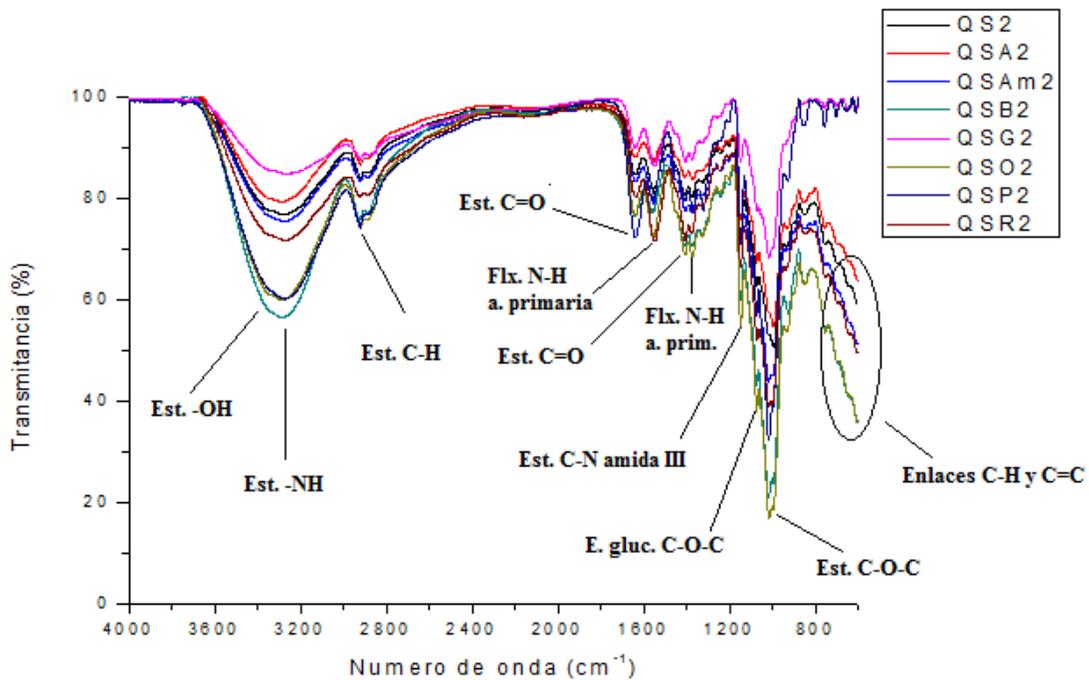


Figura 3.20 Espectro de FTIR comparativo de QS2 vs. Películas con 2% de extracto en peso.

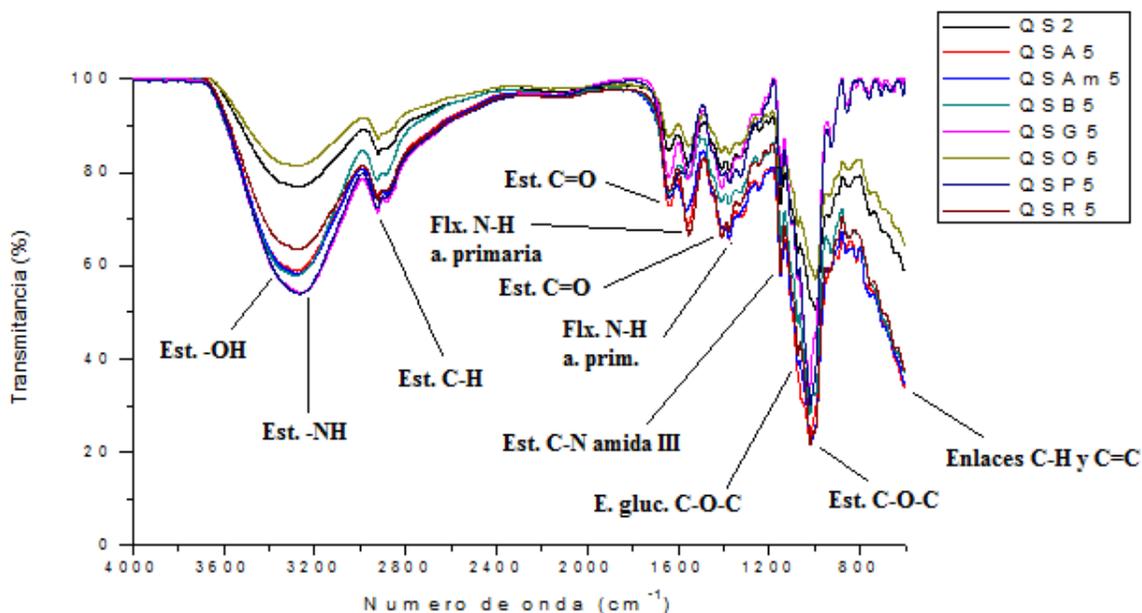


Figura 3.21 Espectro de FTIR comparativo de QS2 vs. Películas con 5% de extracto en peso.

3.8 Espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis)

En las figuras 3.22-3.23 se muestran los espectros UV (obtenidos del promedio de tres corridas) de todas las películas con excepción de QS2 ya que ésta no contiene extractos. Para la cualificación de los diferentes tipos de antioxidantes consideramos la siguiente información: las antocianinas tienen una banda característica alrededor de los 280 nm [109], el timol y el carvacrol a 270 nm [110]. Los polifenoles (las betalainas y el resveratrol son parte de este grupo también) son identificados en la región de 280-350 nm [118]. Debido a que en otras investigaciones no se ha encontrado diferencias importantes en los valores de absorbancia al usar etanol y metanol, preferimos utilizar etanol ya que éste es menos tóxico [119].

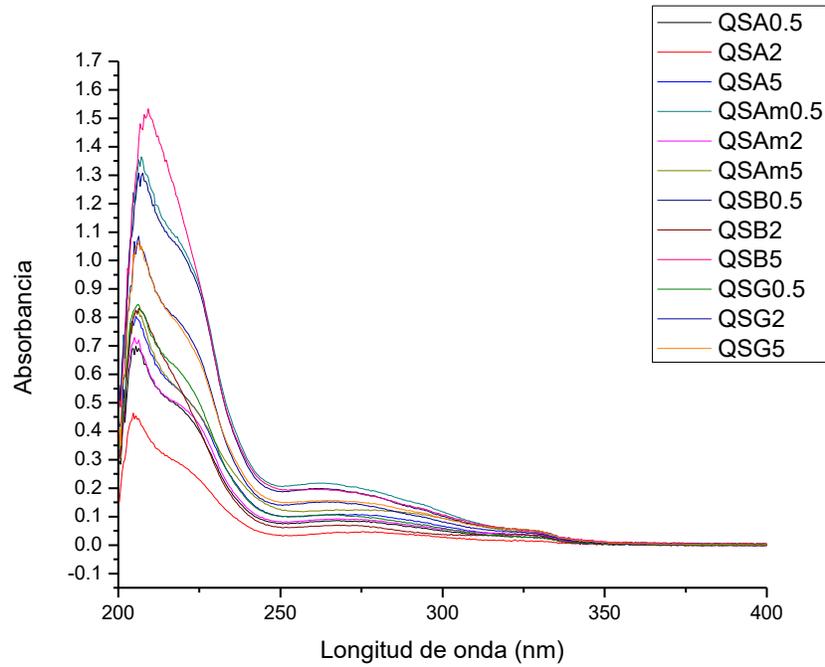


Figura 3.22 Espectro UV de películas con arándano rojo, arándano morado, betabel y granada.

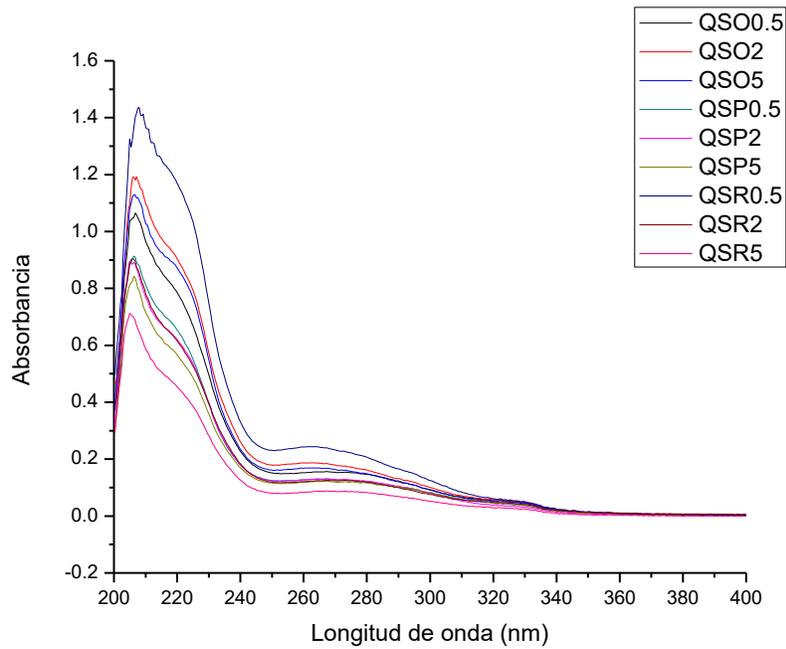


Figura 3.23 Espectro UV de películas con orégano, pitaya y resveratrol.

En la tabla 3.12 se indican las longitudes de onda en las que se encuentran las bandas características de los antioxidantes en cada película. Se observan en todos los casos, un desplazamiento hipsocrómico debido a la presencia de ciertos grupos funcionales tales como carboxilo. También puede deberse al aumento de la polaridad del solvente y acidez del medio. No se observa una relación contundente entre la concentración de extracto utilizado y el valor de absorbancia.

De acuerdo a Guzmán-Figueroa y col. (2010), el arándano rojo contiene antocianinas conocidas como peonidina (42.10 mg/100 g), cianidina (41.80 mg/100 g), delphinidina (7.70 mg/100 g) y malvidina (0.30 mg/100 g); y el arándano morado contiene pelargonidina (61.40 mg/100 g), peonidina (47.40 mg/100 g), malvidina (26.40 mg/100 g), cianidina (17.00 mg/100 g) y petunidina (11.40 mg/100 g) [120]. Pessanha de Araújo y col. (2014) indican que las antocianinas presentes en la granada son delphinidina (8.85 mg/100 g), cianidina (16.28 mg/100 g) y pelargonidina (0.95 mg/100 g) [121]. Ayala y col. (2007) determinaron el contenido de betalainas en betabel, obteniendo los siguientes resultados: betacianinas (526.70 mg/100 g) (349.80 mg/100 g), y de pitaya roja betacianinas (711.90 mg/100 g) (107.97 mg/100 g) [122]. Santos y col. (2012), determinaron que el aceite esencial de orégano obtenido contiene timol (650-750 mg/ml) y carvacrol (40-60 mg/ml) [23]. De acuerdo a la etiqueta de extracto de resveratrol GCN proveniente de uva tiene una concentración de 125 mg/0.7 g.

Tabla 3.12 Longitudes de onda de bandas características de antioxidantes en películas.

| Película | Longitud de onda, nm | Película | Longitud de onda, nm |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| QS2 | ----- | QSG2 | 264.32±0 |
| QSA0.5 | 274.99±1.48 | QSG5 | 264.89±2.10 |
| QSA2 | 275.70±1.23 | QSO0.5 | 269.16±3.58 |
| QSA5 | 273.71±1.54 | QSO2 | 262.90±0.65 |
| QSAm0.5 | 262.61±0.74 | QSO5 | 262.47±1.92 |
| QSAm2 | 267.59±0.49 | QSP0.5 | 266.74±0.98 |
| QSAm5 | 273.14±5.16 | QSP2 | 267.31±0 |
| QSB0.5 | 261.76±0.74 | QSP5 | 261.48±2.46 |
| QSB2 | 267.73±1.13 | QSR0.5 | 262.76±0.25 |
| QSB5 | 262.33±1.07 | QSR2 | 267.73±0.43 |
| QSG0.5 | 265.46±1.72 | QSR5 | 267.31±0 |

Para conocer la cantidad de antioxidantes presentes en cada muestra, se construyó una curva de calibración por triplicado utilizando distintas concentraciones conocidas de ácido gálico: 0, 40, 80, 120, 160 y 200 ppm. Se elaboró un gráfico de calibración de absorbancia en el eje "y" y la concentración en el eje "x" para las soluciones estándar.

Los puntos de datos deben caer a lo largo de una línea recta razonablemente. Utilizando Excel se trazó una línea de tendencia y se encontró la ecuación de la recta para este caso $y = 0.0006x + 0.2096$, donde $m = 0.0006$ y $b = -0.2096$ con una regresión lineal de 0.9971.

Se sustituyó la absorbancia a 765 nm de cada solución de concentración desconocida en la ecuación determinada como igual a "y" y se resolvió la ecuación para encontrar "x", en la cual esta variable representa la concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.24 y la tabla 3.13.

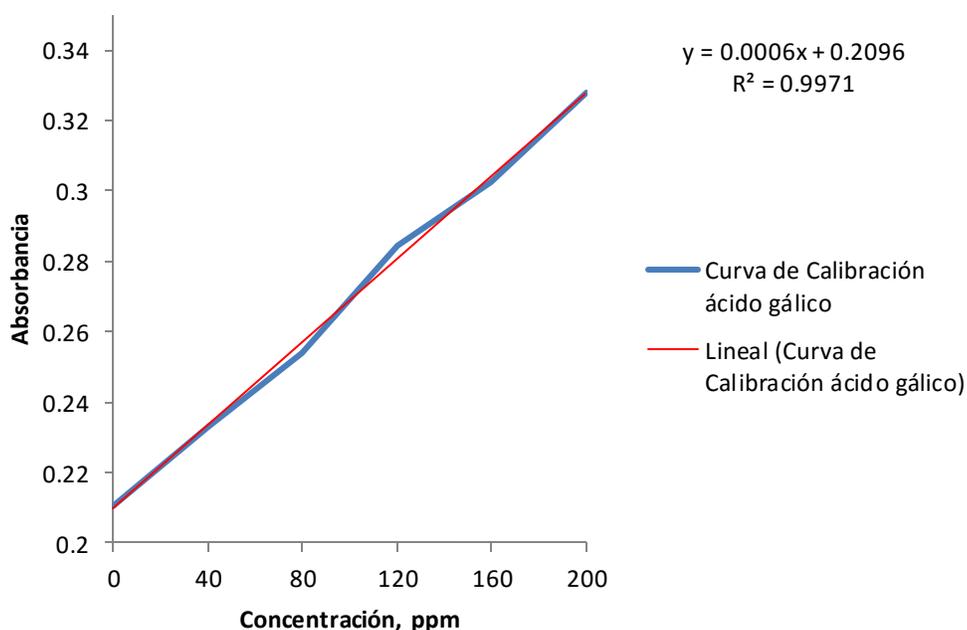


Figura 3.24 Curva de calibración de ácido gálico.

Tabla 3.13 Concentraciones de antioxidantes presentes en cada película en mg equivalentes a mg de ácido gálico.

| Película | Concentración, ppm | Película | Concentración, ppm |
|-----------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|
| QS2 | ----- | QSG2 | 0.20984±2.64E-6 |
| QSA0.5 | 0.21001±4.85E-5 | QSG5 | 0.20997±2.15E-5 |
| QSA2 | 0.20991±1.61E-5 | QSO0.5 | 0.21003±2.73E-5 |
| QSA5 | 0.20992±6.65E-5 | QSO2 | 0.21020±1.46E-4 |
| QSAm0.5 | 0.20998±6.23E-5 | QSO5 | 0.21003±6.92E-6 |
| QSAm2 | 0.20997±4.69E-5 | QSP0.5 | 0.20997±3.48E-6 |
| QSAm5 | 0.20999±6.37E-5 | QSP2 | 0.21002±4.06E-5 |
| QSB0.5 | 0.20994±9.18E-5 | QSP5 | 0.21008±6.67E-5 |
| QSB2 | 0.21004±7.27E-6 | QSR0.5 | 0.20995±5.63E-5 |
| QSB5 | 0.20998±9.18E-5 | QSR2 | 0.21005±5.82E-6 |
| QSG0.5 | 0.21003±2.73E-5 | QSR5 | 0.21005±5.58E-5 |

Se observa que las cantidades de antioxidantes no difieren mucho entre sí. Así que podemos deducir que lo importante no es la cantidad sino el tipo de antioxidante que se utiliza, esto es lo que verdaderamente potencia o modifica las propiedades antimicrobianas, mecánicas, ópticas y térmicas; se observó que las antocianinas y las betalainas de betabel obtuvieron los mejores resultados, esto puede atribuirse a su mayor estabilidad ante las condiciones ambientales [6] [30-31]. Ver sección 3.2, 3.5, 3.10 y 3.11.

3.9 Espectroscopía Raman

En los espectros Raman de las películas QS2, QSA2, QSG2, QSG5, QSO2, QSR2 y QSR5 (figuras 3.25-3.26) se observa el fenómeno de fluorescencia (existe una superposición de las bandas D y G). Este fenómeno es mucho más común en la región Stokes (zona con valores positivos/mayores a cero). La intensidad de la fluorescencia es mayor que la intensidad de la dispersión Raman, por lo que es frecuente obtener un espectro Raman en él que sólo observemos fluorescencia impidiendo obtener mayor información sobre el material. Este tipo de espectros es común cuando la solución de quitosano es preparada con ácido acético, ya que éste otorga al material un bajo valor de cristalinidad [118,123].

Sólo fue posible deducir que se tiene un material compuesto orgánico y amorfo, con pocas regiones cristalinas. Se observa que la presencia de extractos no modifica esto, sólo el valor de intensidad. De acuerdo a Jaworska y col. (2003) y Espíndola-González y col. (2011), cuando el quitosano se prepara utilizando ácido acético, los materiales presentan baja cristalinidad [118,123]. Según Ferrari (2007) y Ferrari y col. (2000), los compuestos amorfos de carbono presentan este tipo de espectros Raman, cuando un material presenta menor cristalinidad, baja la intensidad y se ensancha la banda. [124-125]. Se confirmó el carácter amorfo de todas las películas, comparando el inicio de cada curva de módulo de almacenamiento. Se observó una disminución en los valores de módulo de almacenamiento inicial a 35-40 ° C, lo cual es un indicativo de un material principalmente amorfo, ver sección 3.10.1. La disminución de la cristalinidad también beneficia la actividad antimicrobiana [12].

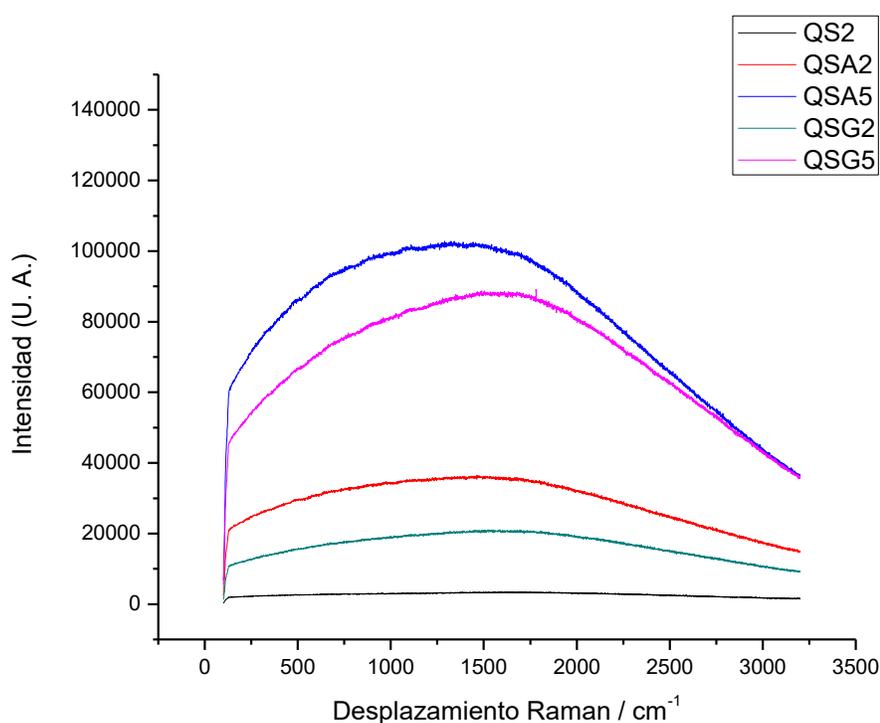


Figura 3.25 Espectro Raman de QSA2, QSA5, QSG2 y QSG5 vs QS2.

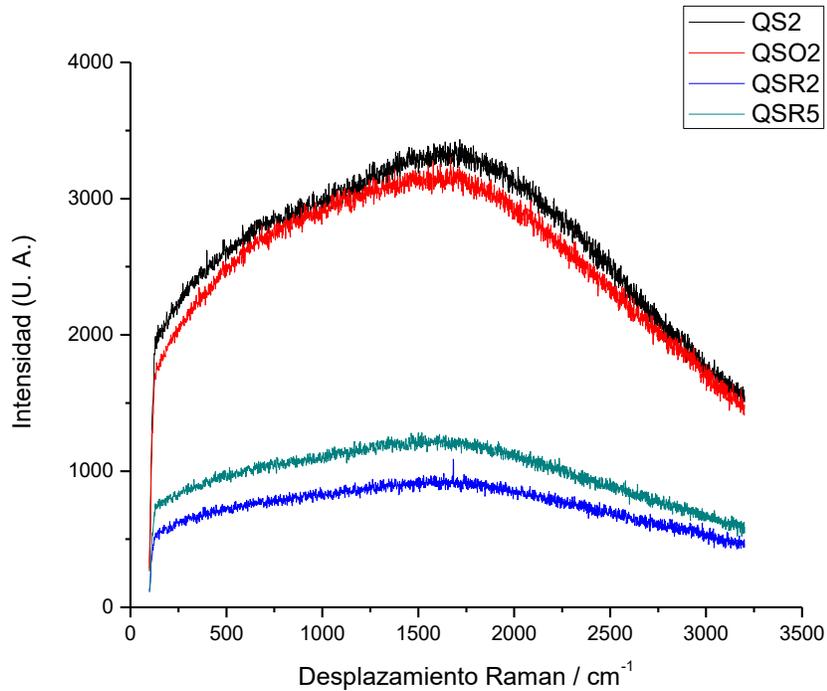


Figura 3.26 Espectro Raman de QSO2, QSR2 y QSR5 vs QS2.

3.10 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido se muestra la morfología en las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales a diversas magnificaciones: 500x, 750x, 1500x y 5000x.

En la figura 3.27 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón QS2. Se muestra una superficie técnicamente homogénea sin separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observa la presencia de líneas acanaladas o estrías y puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película muestra nula actividad contra mesofílicos aerobios así como poca actividad ante coliformes totales y hongos. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

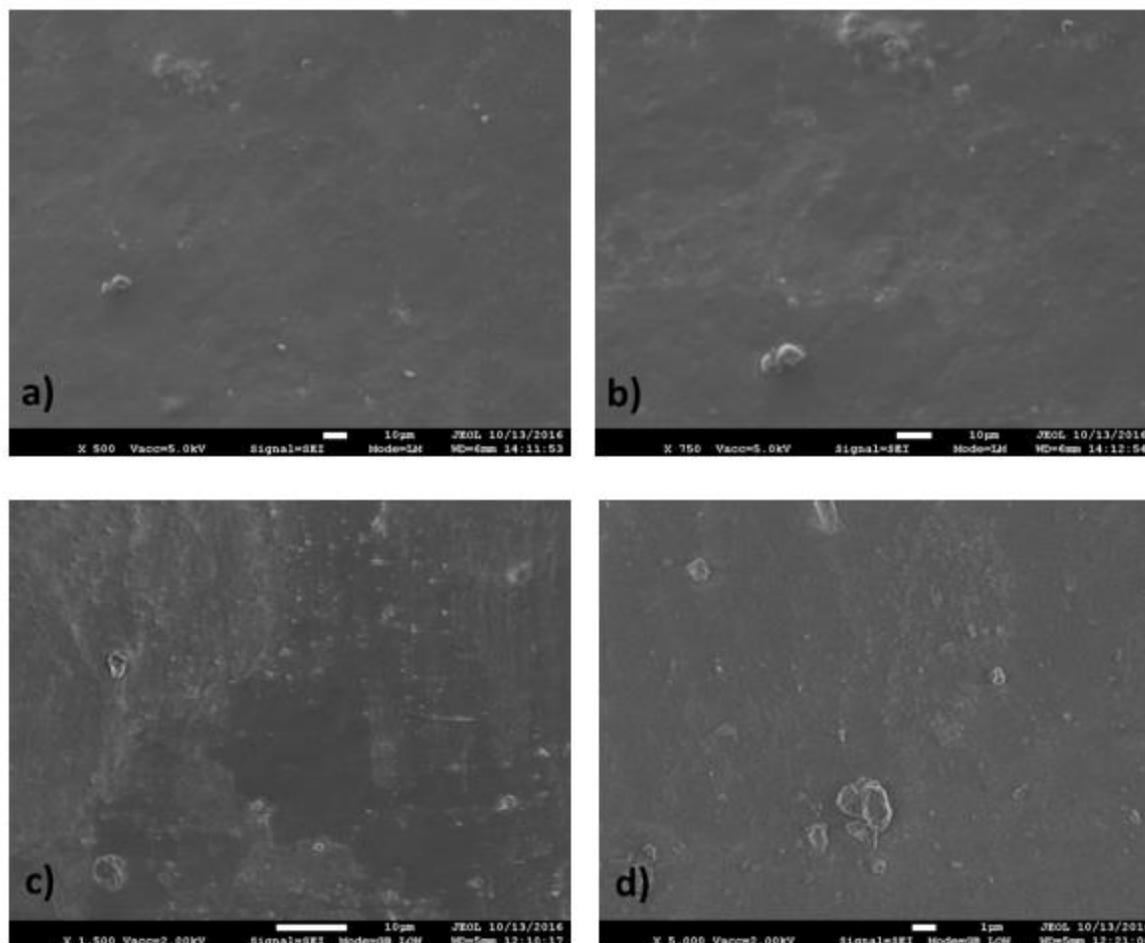


Figura 3.27 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón QS2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.28 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con arándano rojo QSA0.5. Se muestra una superficie en la que se presentan concavidades de un diámetro considerable, las cuales en su interior también presentan estrías o líneas acanaladas. No se muestra separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observa la presencia de puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios y coliformes, así como una actividad media ante hongos. Es una de las mejores películas antimicrobianas de esta investigación. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

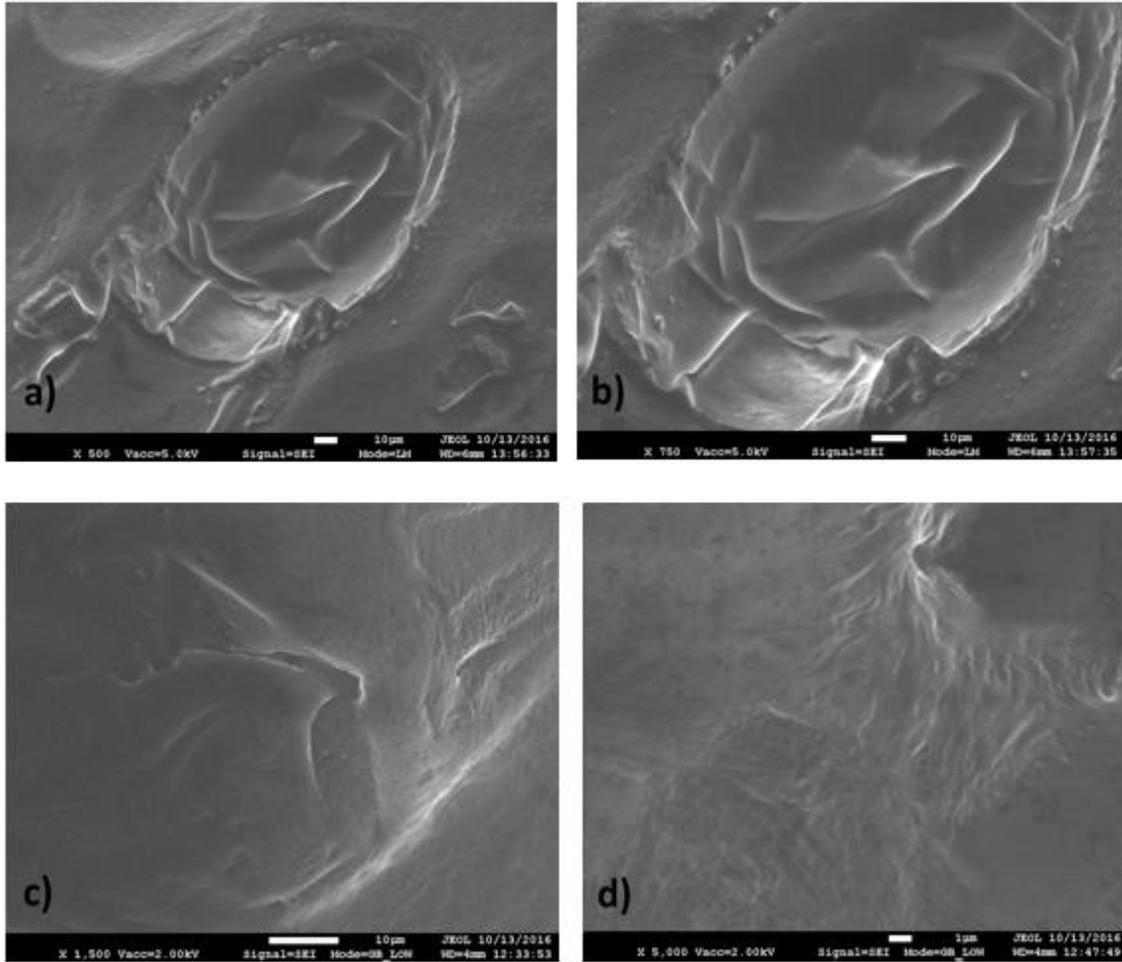


Figura 3.28 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con arándano rojo QSA0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.29 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con arándano rojo QSA5. Se muestra una superficie homogénea sin separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observa la presencia de líneas acanaladas o estrías y puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesófilos aerobios, coliformes y hongos. Es la película con arándano rojo que presentó la mejor actividad antimicrobiana durante las pruebas. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

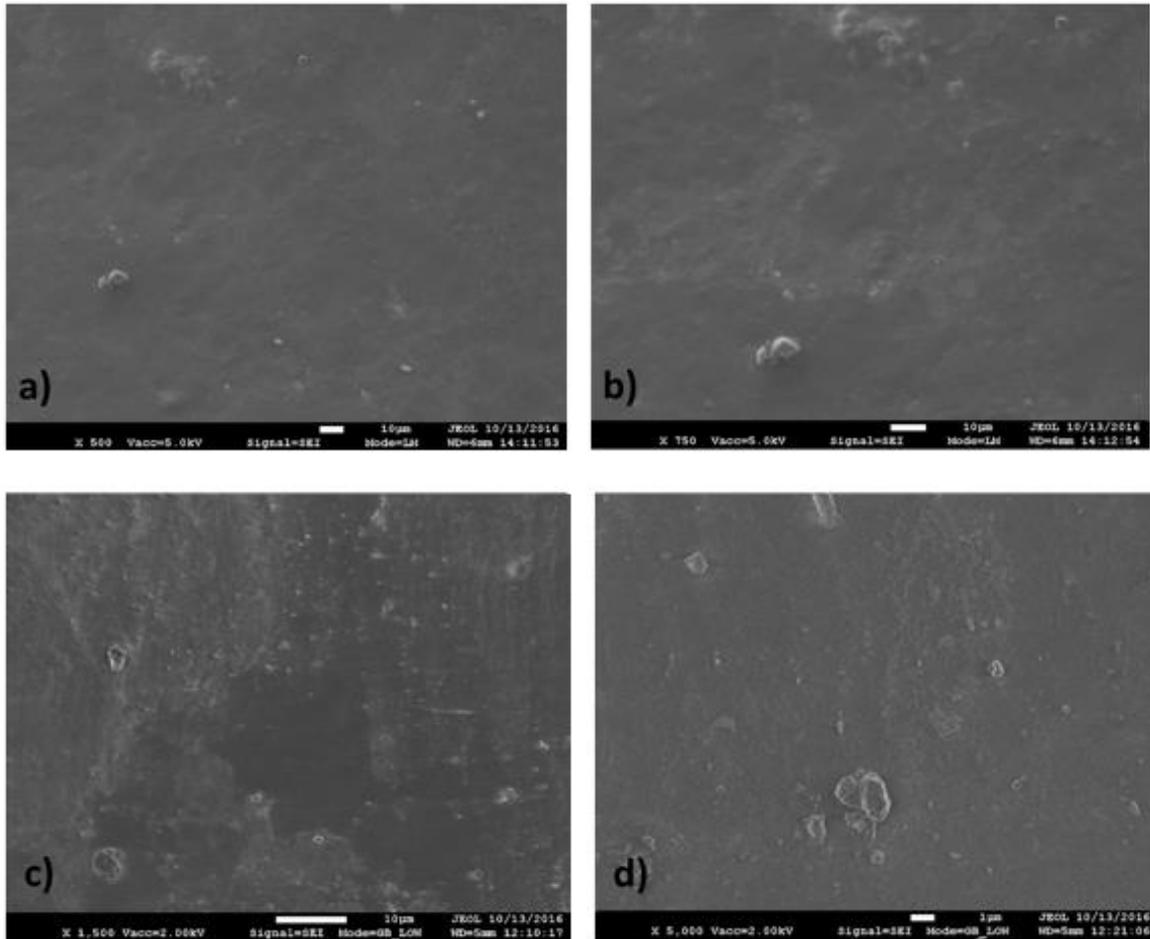


Figura 3.29 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con arándano rojo QSA5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.30 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con arándano morado QSA5. Se muestra una superficie que presenta en su morfología concavidades de tamaño considerable y en su interior se observan líneas acanaladas o estrías. Se observa la presencia de placas blancas asociados a la acumulación de almidón en la zona analizada [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios, coliformes y hongos, aunque es mejor QSA5. Es la película con arándano morado que presentó la mejor actividad antimicrobiana durante las pruebas. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

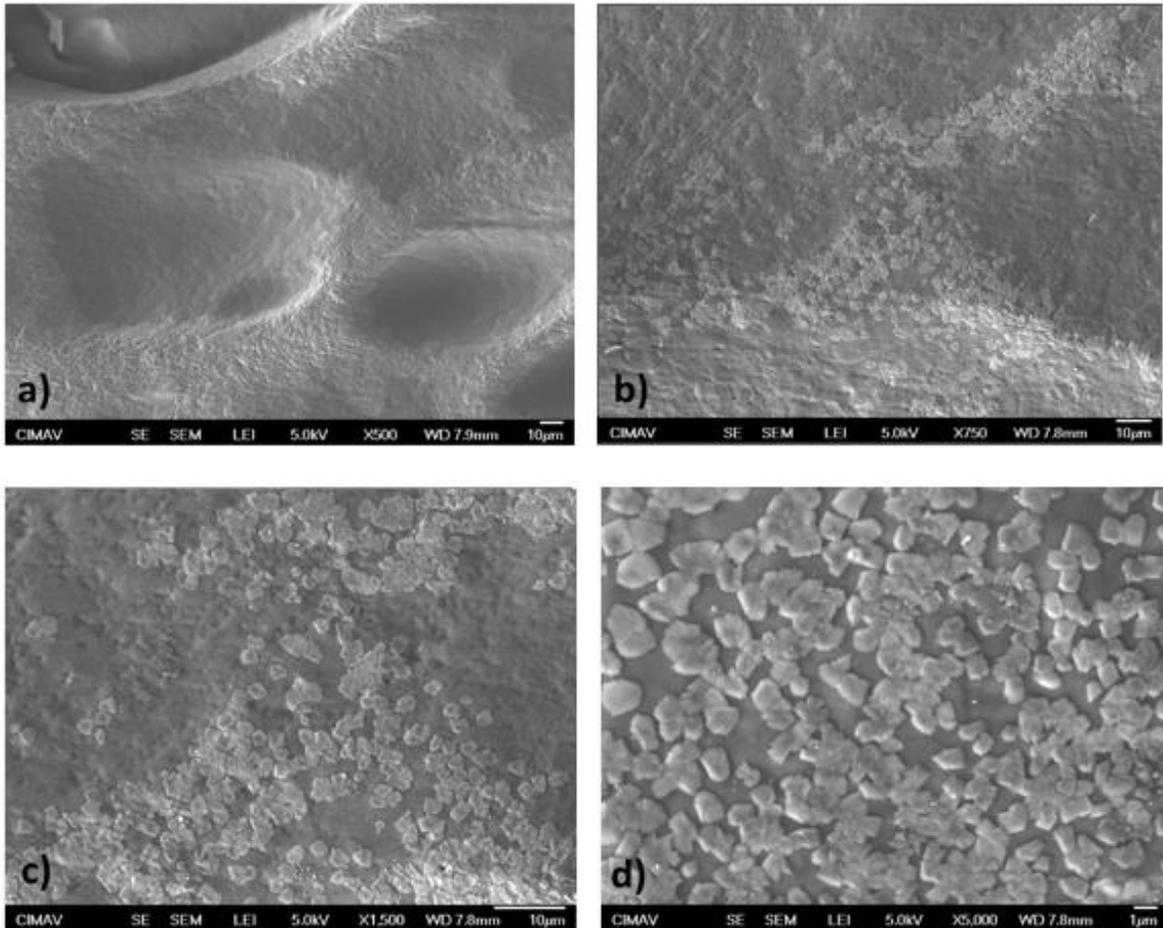


Figura 3.30 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con arándano morado QSAm5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.31 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con betabel QSB0.5. Se muestra una superficie homogénea sin separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observan pocas concavidades y la presencia de líneas acanaladas o estrías, así como puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios y hongos, aunque muy mala actividad ante coliformes. Es una de las películas que presentó una mejor actividad contra hongos. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

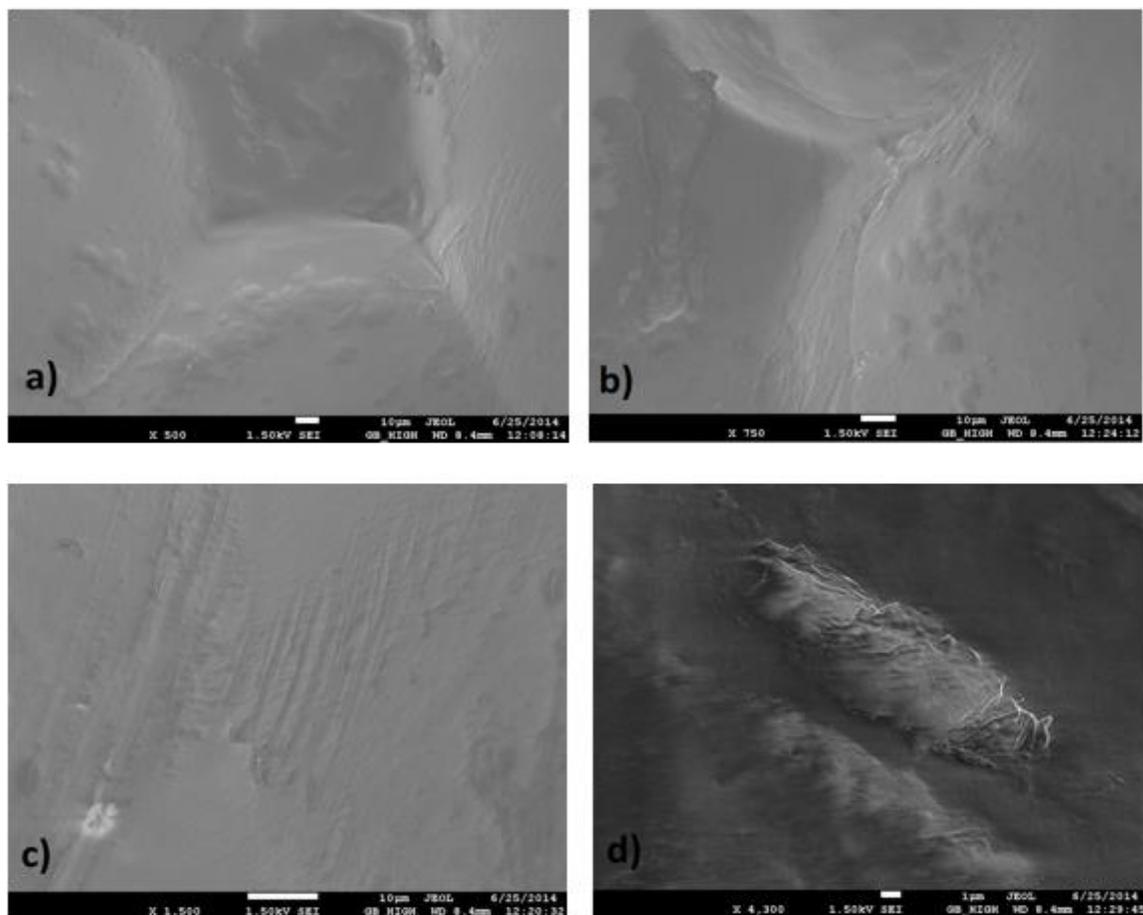


Figura 3.31 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con betabel QSB0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.32 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con betabel QSB2. Se muestra una superficie que presenta en su morfología pocas concavidades de tamaño considerable (en comparación con QSAm5) y en su interior se observan líneas acanaladas o estrías. Se observan líneas acanaladas y estrías, así como la presencia de plaquetas blancas asociadas a la acumulación de almidón en la zona analizada [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios y hongos, aunque muy mala actividad ante coliformes. Es una de las películas que presentó una mejor actividad contra hongos. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

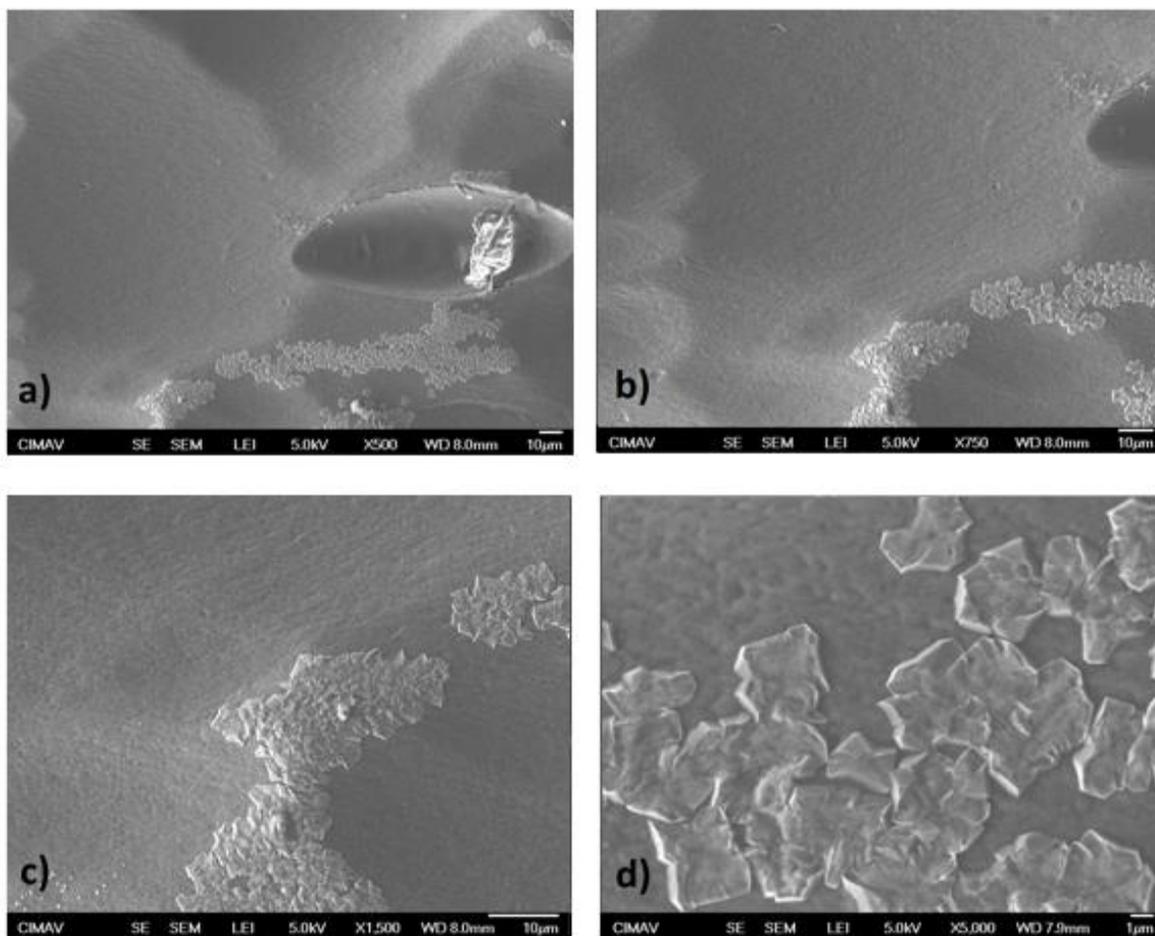


Figura 3.32 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con betabel QSB2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.33 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con betabel QSB5. Se muestra una superficie rugosa, aparentemente sin separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observa la presencia de líneas acanaladas o estrías y cúmulos/puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios y hongos, aunque muy mala actividad ante coliformes. Es de las mejores películas contra hongos. Todas las películas con betabel tienen los mismos niveles de actividad antimicrobiana. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

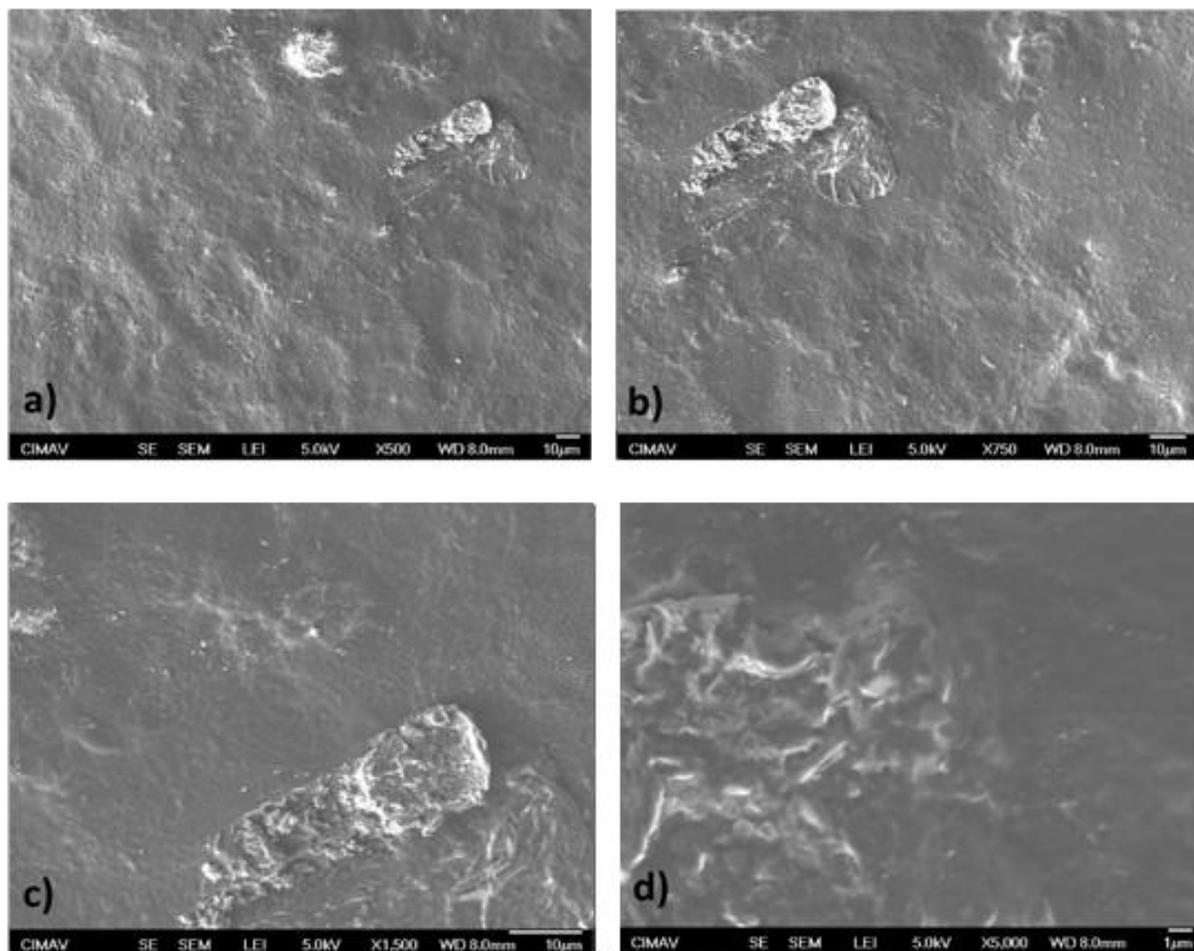


Figura 3.33 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con betabel QSB5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.34 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con granada QSG2. Se muestra una superficie homogénea sin separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observan concavidades de menor tamaño que en caso de otras películas, así como la presencia de líneas acanaladas o estrías y cúmulos/puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios, una actividad media contra coliformes y muy mala actividad ante hongos. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

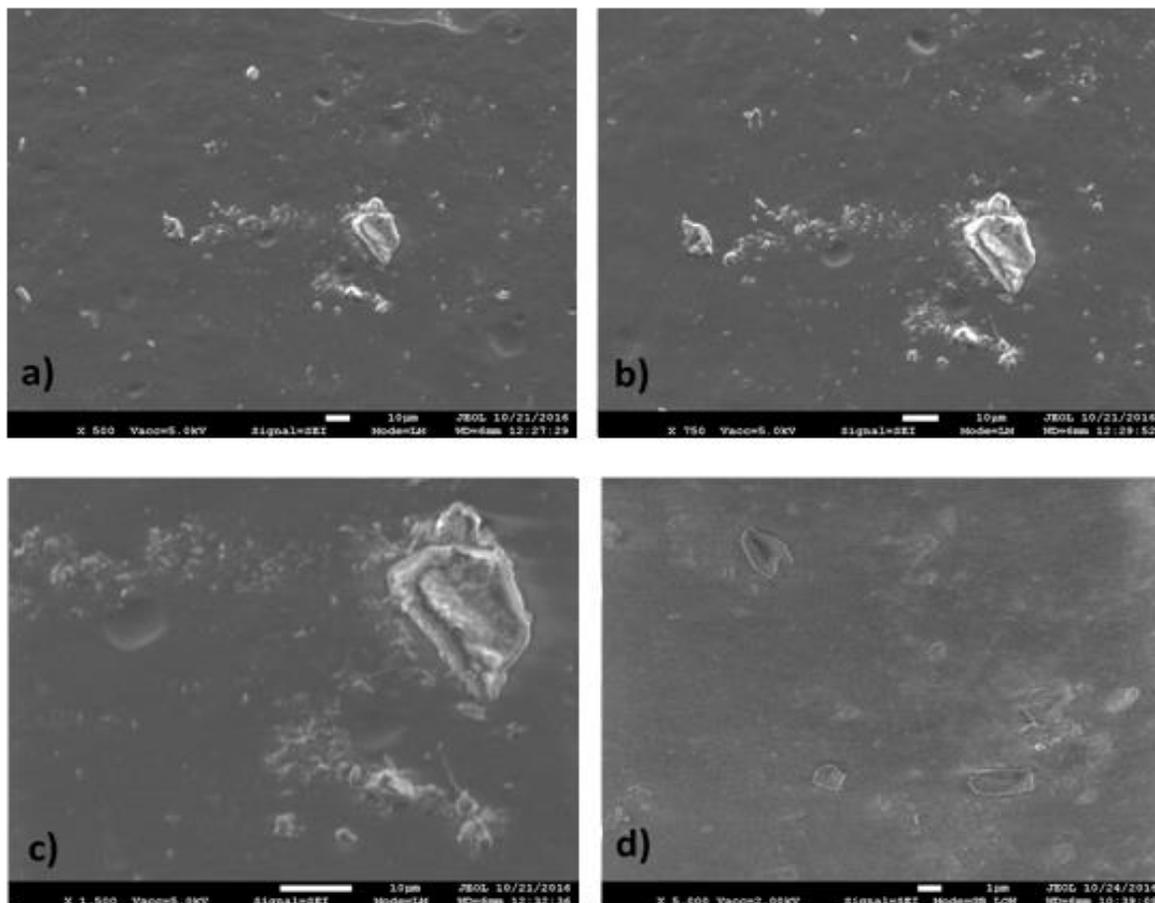


Figura 3.34.- Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con granada QSG2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.35 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con granada QSG5. Se muestra una superficie homogénea sin separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observa la presencia de líneas acanaladas o estrías y cúmulos/puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios (en todas las pruebas) y contra coliformes y muy mala actividad ante hongos. Es la mejor película antimicrobiana con granada. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

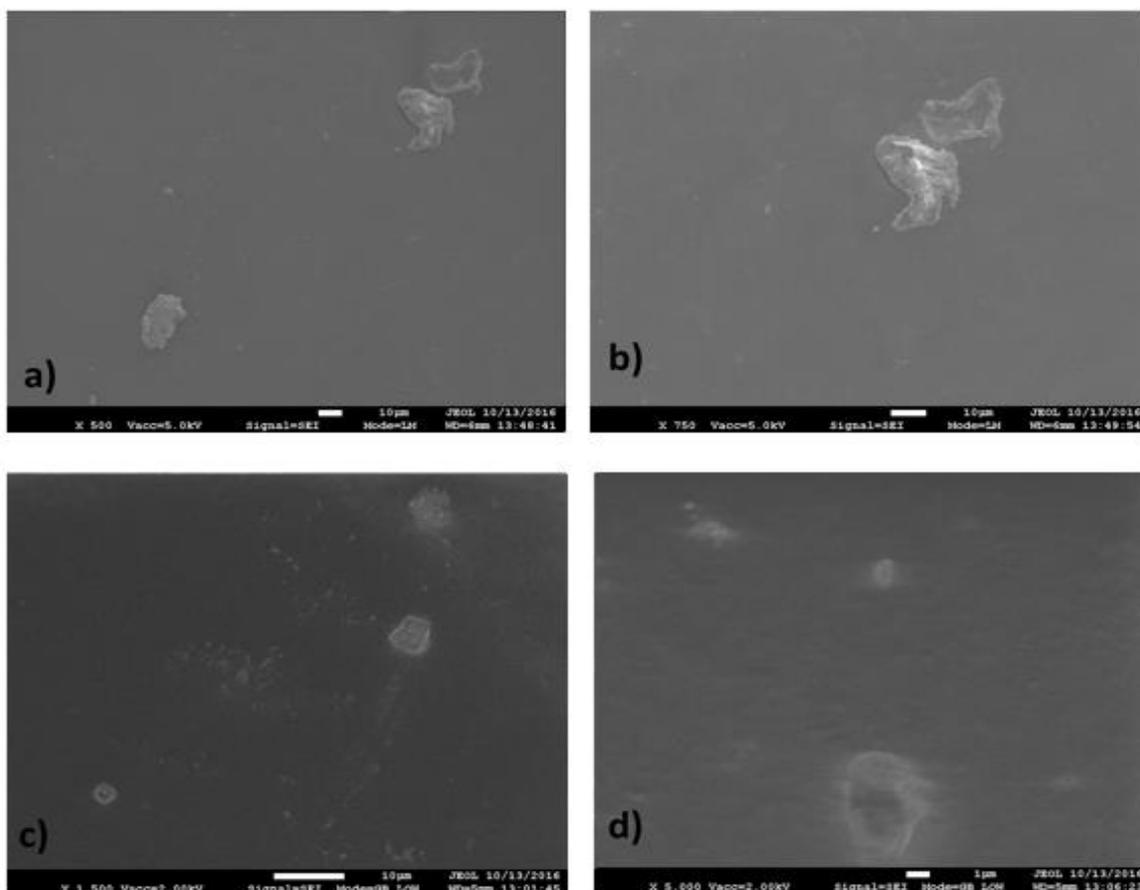


Figura 3.35.- Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con granada QSG5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.36 se muestran las imágenes obtenidas sobre la película de quitosano-almidón con extracto acuoso de orégano QSO5. Se muestra una superficie que presenta en su morfología pocas concavidades de tamaño considerable (en comparación con QSA_{m5}) y en su interior se observan líneas acanaladas o estrías. Se observan líneas acanaladas y estrías, así como la presencia de hojuela blancas asociadas a la acumulación de almidón en la zona analizada [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios (en todas las pruebas) y contra coliformes, así como una actividad media ante hongos. Es la mejor película antimicrobiana con orégano. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

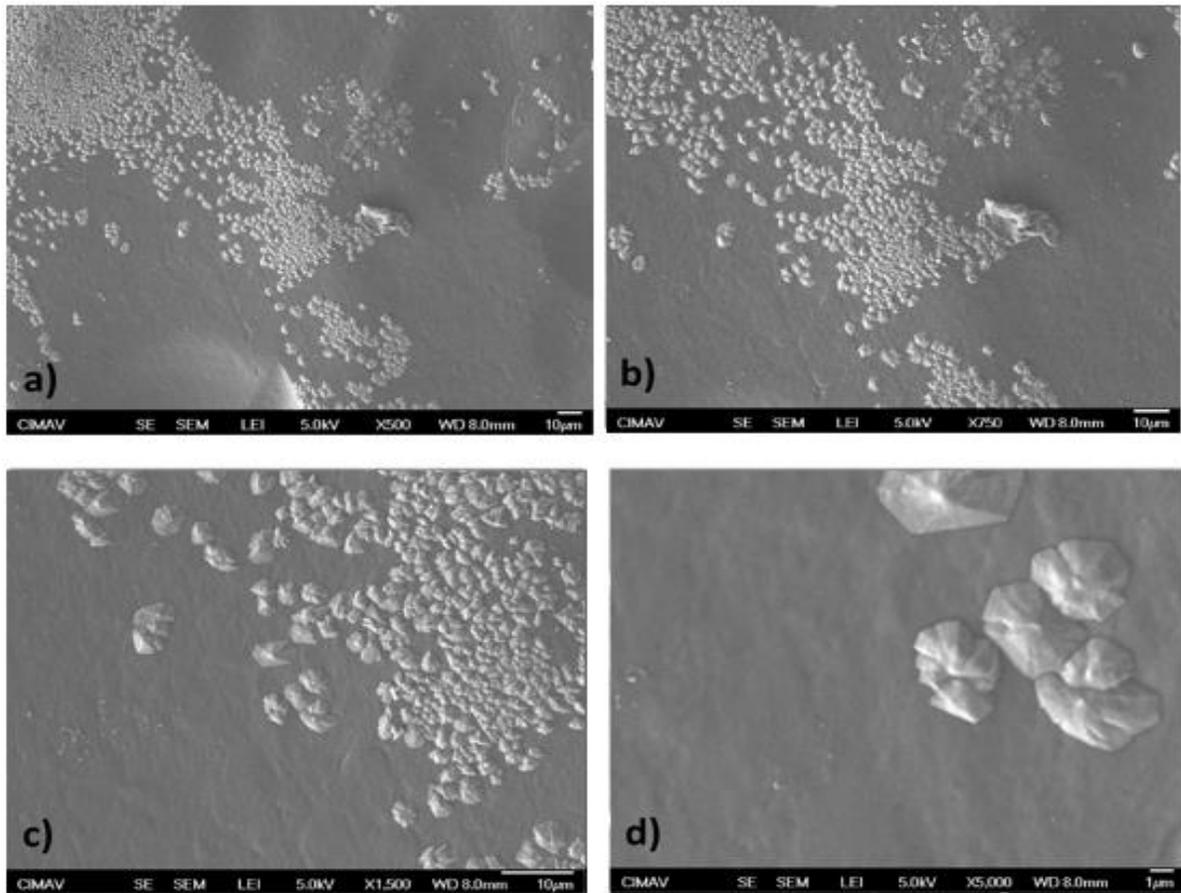


Figura 3.36 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con orégano QSO5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.37 se muestran las imágenes obtenidas sobre la película de quitosano-almidón con pitaya QSP0.5. Se muestra una superficie que presenta en su morfología concavidades de tamaño considerable y en su interior se observan líneas acanaladas o estrías. Se observan líneas acanaladas y estrías, así como la presencia de cúmulos/puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios y contra hongos, pero no tiene un buen efecto fungicida y presenta una mala actividad ante coliformes. Es la mejor película antimicrobiana con pitaya. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

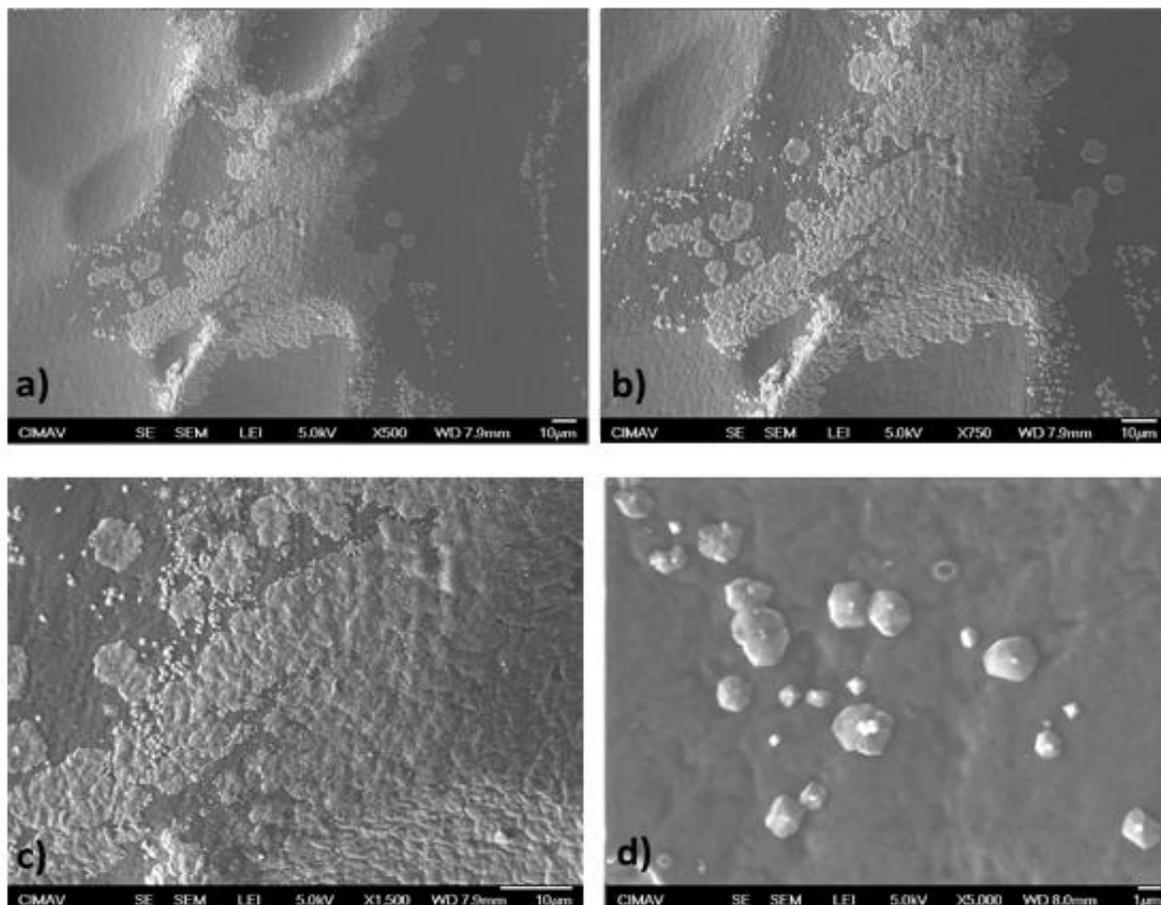


Figura 3.37 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con pitaya QSP0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

En la figura 3.38 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano-almidón con resveratrol QSR5. Se muestra una superficie en la que se presentan concavidades de un diámetro considerable, las cuales en su interior también presentan estrías o líneas acanaladas. No se muestra separación de fases entre los polisacáridos, indicativo de una buena interacción entre los componentes. Se observa la presencia de puntos blancos asociados a la presencia de almidón [117] [126-127]. Esta película tiene una excelente actividad contra mesofílicos aerobios y contra coliformes, así como una actividad media ante hongos. Es la mejor película antimicrobiana con resveratrol. Ver sección 3.2.3.1-3.2.3.3.

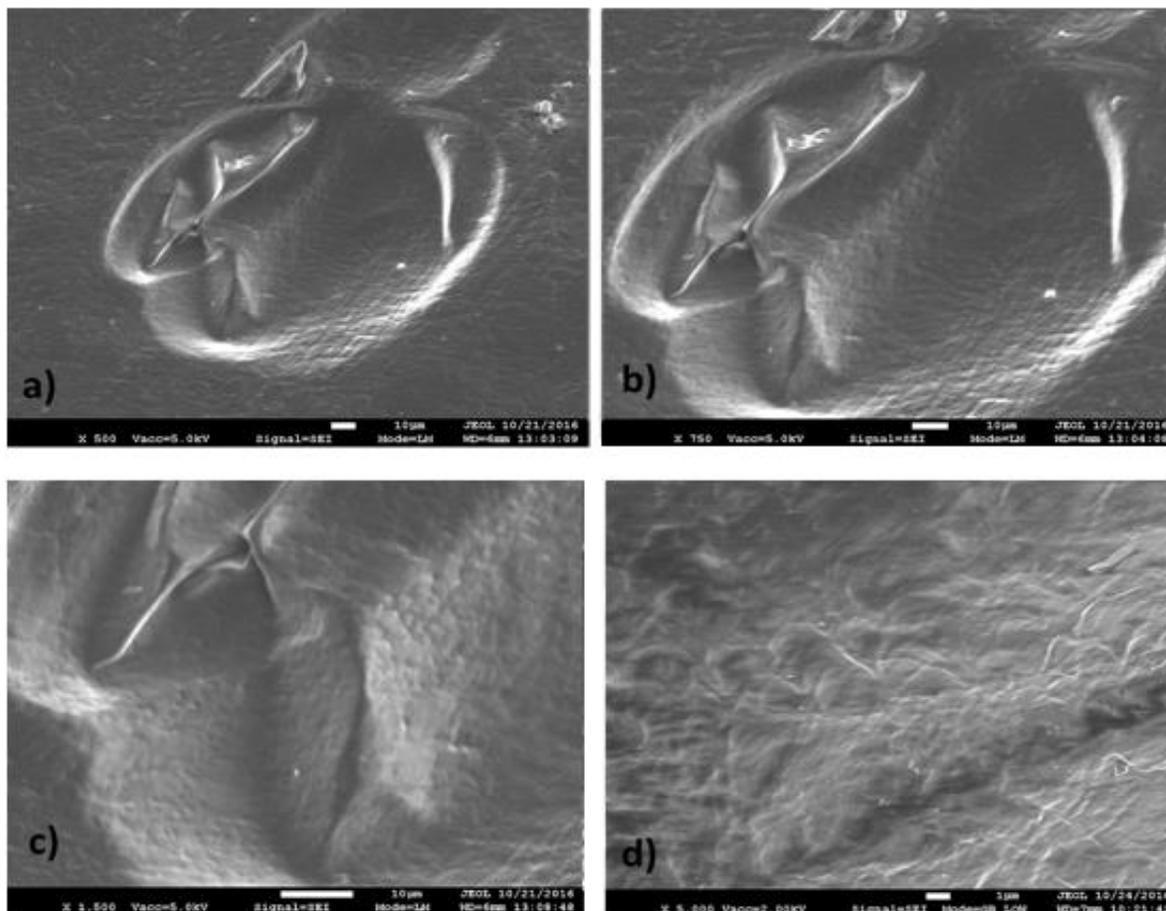


Figura 3.38 Micrografías SEM de la película de quitosano-almidón con resveratrol QSR5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x, b) 500 x, c) 750 x y d) 1500 x.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Microscopía Electrónica de Barrido, es posible concluir que la morfología de las películas se ve modificada por la presencia de extractos naturales, sin embargo los tipos de morfología no presentan una relación concreta con la actividad antimicrobiana, ver sección 3.2. Por ejemplo, las películas analizadas con SEM que presentaron la mejor actividad antimicrobiana contra los tres grupos de microorganismos son: QSA5 (superficie homogénea), QAm5 y QSO5 (en ambas presencia de cúmulos de almidón).

3.11 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

3.11.1 Módulo de almacenamiento (E')

En la tabla 3.14 se muestran los resultados de las pruebas realizadas a las películas para determinar su módulo de almacenamiento (E') a 50° y 100 °C. En las figuras 3.39-3.40 se muestran las curvas de módulo de almacenamiento de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes en comparación con QS2. Se observa que la adición de los extractos naturales reduce de manera significativa los valores de módulo de almacenamiento, esto significa que las películas son menos rígidas, lo cual se puede observar también a simple vista. Se observa que a medida que aumenta la temperatura los valores de E' disminuye.

En las curvas de almacenamiento de las películas QS2, QSA0.5, QSA2, QSA5, QSAm5, QSG5, QSP0.5 y QSP5 se observan más claramente 3 regiones que coinciden con los resultados obtenidos por Al-Sagheer y col. (2011) [128]. La primera curva abarca desde la más baja temperatura hasta aproximadamente 80-90 °C que es la región cristalina, donde los movimientos de las moléculas están restringidos. La segunda región es la transicional entre la cristalina y la elástica, donde la rotación de las cadenas principales y laterales se lleva a cabo al aumentar la temperatura, esto va desde 80-90° hasta 130-150 °C. En esta región el módulo de almacenamiento presenta un aumento y una posterior disminución en su valor (con excepción de QS2, QSAm5 y QG5, en las dos primeras existe un proceso de disminución y en el tercero un proceso de aumento únicamente) debido a la presencia de almidón, el cual actúa como plastificante [128]. La tercera región es conocida como viscoelástica y en ella la deformación a través del tiempo marca la temperatura de transición vítrea o T_g , esta región se ubica entre 130-150 hasta 200 °C. Se observa un ligerísimo aumento en el módulo de almacenamiento al final de la curva, esto puede ser debido a la rápida alineación de las cadenas poliméricas bajo el esfuerzo aplicado [128].

En el caso de las películas QSO5 y QSR5 no se muestran estos comportamientos. Se observa que al aumentar la concentración de extractos disminuyen los valores de E' . Las películas QSA0.5, QSA2, QSA5, QSG5 y QSP0.5 tienen valores medios de E' , lo cual podría resultar muy adecuado ya que estas películas no son rígidas y presentan la mejor

actividad antimicrobiana de todas las películas analizadas mediante DMA, ver sección 3.2. Hasta el momento, no se conocen reportes de comportamientos similares a estos en otras investigaciones.

Se conoce el efecto plastificante del almidón y del glicerol, pero para este trabajo se decidió que no eran variables experimentales, ya que existe una investigación diversa del efecto de los plastificantes sobre el quitosano [129]. Las cantidades de almidón y glicerol utilizadas en este estudio fueron constantes. El cambio en las propiedades mecánicas y la flexibilidad presentes en cada película se puede atribuir a las interacciones de almidón, glicerol y los extractos, que poseen antioxidantes. Estos compuestos son polifenoles, que contienen grupos -OH que forman varios enlaces con la matriz polimérica (por ejemplo, enlaces de hidrógeno) [62].

Según Bonilla y col. (2012), la disminución de los valores de módulo de almacenamiento en películas con quitosano puede atribuirse a la incorporación de compuestos naturales tales como antioxidantes y terpenos. Esta disminución se produce por discontinuidades en la estructura de la película y la falta de cohesión entre las cadenas poliméricas. Se deduce que nuestros resultados se consideran favorables debido al efecto plastificante de polifenoles a partir de extractos naturales que, como explican las investigaciones antes mencionadas, estos compuestos dan un desplazamiento más suave de cadenas poliméricas durante el estiramiento de películas, posibilita la deformación de cada película sin daños [130].

Según Albarracín-Hernández y col. (2014), incluir alfa tocoferol (compuesto precursor de la vitamina E) en películas de quitosano se puede modificar los enlaces químicos del polímero y propiciar fenómenos como la reducción de la cristalinidad, el contenido de agua, la resistencia a la tensión y la elongación, y el aumento de la opacidad, así como mejora la capacidad antioxidante y la permeabilidad al vapor de agua de las películas de quitosano [131].

Hemos observado el decremento en los valores de módulo de almacenamiento inicial (ver los valores de E a 35-40 ° C en las figuras 3.39-3.40), se relaciona con un material menos cristalino. La disminución de la cristalinidad, beneficia la actividad

antimicrobiana (ver tabla 3.3). El orden de cristalinidad es el siguiente: QS2> QSA2> QSA5> QSA0.5> QSG5> QSAm5> QSP5> QSP0.5> QSO5> QSR5. El decremento de la cristalinidad de la película reduce las fuerzas intermoleculares dando una película menos rígida y menos frágil.

Tabla 3.14 Valores de módulo de almacenamiento (E') de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales y QS2.

| Película | Prueba 1 E' (MPa) | | Prueba 2 E' (MPa) | |
|----------|---------------------|--------|---------------------|--------|
| | 50 °C | 100 °C | 50 °C | 100 °C |
| QS2 | 4753 | 3093 | 3503 | 2922 |
| QSA0.5 | 3001 | 1967 | 2917 | 1789 |
| QSA2 | 3868 | 2633 | 3644 | 2346 |
| QSA5 | 2982 | 2065 | 2786 | 1589 |
| QSAm5 | 1956 | 334 | 1227 | 508 |
| QSG5 | 2407 | 665 | 1726 | 309 |
| QSO5 | 494 | 250 | 910 | 393 |
| QSP0.5 | 1668 | 838 | 1511 | 787 |
| QSP5 | 925 | 376 | 1227 | 508 |
| QSR5 | 455 | 108 | 426 | 250 |

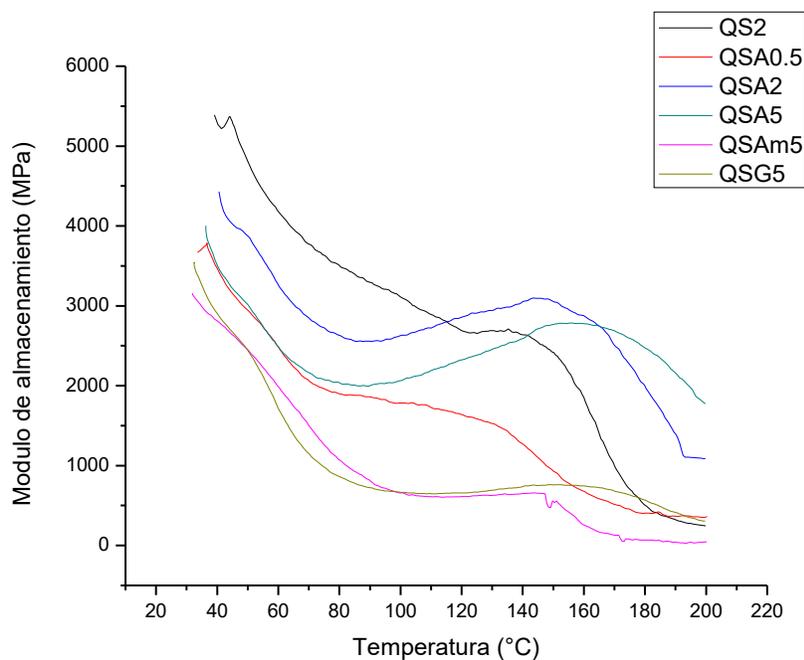


Figura 3.39 Termograma DMA de muestras QS2, QSA0.5, QSA2, QSA5, QSAm5 y QSG5, Módulo de almacenamiento (E') vs. Temperatura.

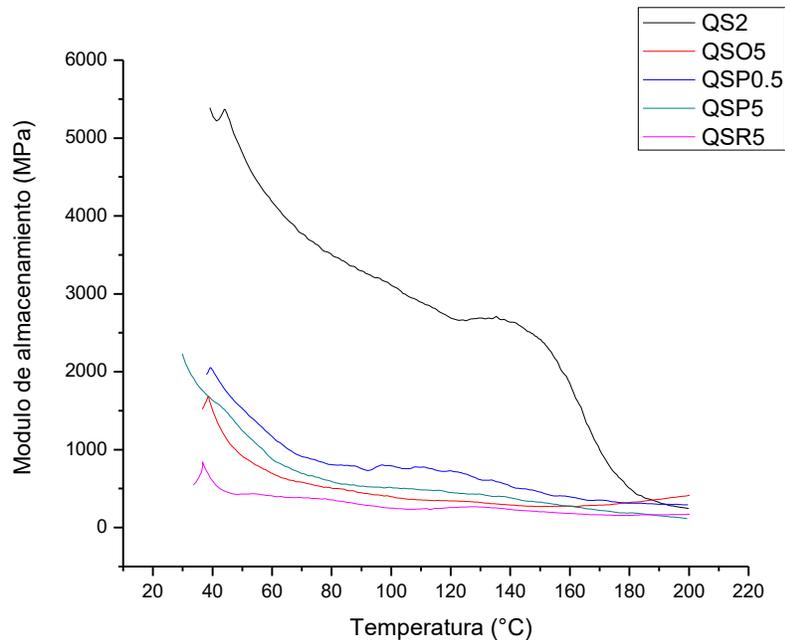


Figura 3.40 Termograma DMA de muestras QS2, QSO5, QSP0.5, QSP5 y QR5, Módulo de almacenamiento (E') vs. Temperatura.

3.11.2 Temperatura de transición vítrea (T_g) utilizando DMA

En la tabla 3.15 se muestran los resultados de las pruebas realizadas a las películas para determinar su temperatura de transición vítrea (T_g). En las Figuras 3.41-3.42 se muestran las curvas de tan delta así como las T_g de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales en comparación con QS2.

Se debe considerar lo siguiente: 1) La T_g del quitosano en solución de ácido acético es de 203 °C [96] [132]. Se observa una disminución de la T_g en la cada una de las muestras debido a la miscibilidad de los componentes [133]. Al final de algunas de las curvas de tan delta (QS2, QSA0.5, QSO5 y QSP5) se observa una disminución asociada a la desorción de agua [134]. Esta clase de disminución se observa en casos donde el quitosano es mezclado con otros compuesto, por ejemplo la adición de ciertos compuestos tales como el polihidroxitirato (PHB) reduce considerablemente la T_g del quitosano, en este caso a 103 °C. El PHB es producido en la Naturaleza por microorganismos (almacenamiento de energía) en respuesta a condiciones de estrés fisiológico, es

principalmente un producto a partir de glucosa o almidón [135]. Los antioxidantes adicionados a las muestras son compuestos producidos por las plantas en situaciones de estrés [34]. Una zona de transición más ancha puede indicar una posible reacción entre los grupos funcionales de los extractos (antioxidantes) y la matriz de las muestras o bien que el material analizado tiene una mayor cantidad de componentes que QS2. Se propone que está reacción es la descomposición de los antioxidantes, ya que estos son muy inestables ante altas temperaturas (50° a 100 °C, mientras más aumenta la temperatura se acelera la degradación de los antioxidantes) [136]. Esto puede relacionarse con una mayor banda a 3420 cm⁻¹ (estiramiento –OH) en los espectros infrarrojos de las películas con extractos debido a la presencia de los componentes de los extractos naturales tales como sacáridos, agua, ácidos carboxílicos, etc.

Se puede deducir que estos materiales pueden ser usados como embalaje de alimentos ya que tiene valores de Tg o temperatura de trabajo superiores a los 80 °C, y también presentan una buena actividad antimicrobiana ver sección 3.2.

Tabla 3.15 Valores de Tg y tan delta de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales y QS2.

| Película | Prueba 1 | | Prueba 2 | |
|----------|----------|--------|----------|---------|
| | Tg, °C | tan δ* | Tg, °C | tan δ * |
| QS2 | 182.3 | 0.54 | 188.0 | 0.533 |
| QSA0.5 | 160.9 | 0.31 | 155.8 | 0.349 |
| QSA2 | 85.7 | 0.151 | 94.5 | 0.181 |
| QSA5 | 81.4 | 0.148 | 92.8 | 0.154 |
| QSG5 | 103.6 | 0.297 | 100.3 | 0.365 |
| QSO5 | 95.3 | 0.472 | 91.2 | 0.446 |
| QSP0.5 | 101.7 | 0.312 | 102.4 | 0.329 |
| QSP5 | 95.9 | 0.367 | 94.6 | 0.360 |
| QSR5 | 87.4 | 0.569 | 89.8 | 0.514 |

*Los valores de tan δ corresponden a la Temperatura de transición vítrea indicada en la tabla 3.15.

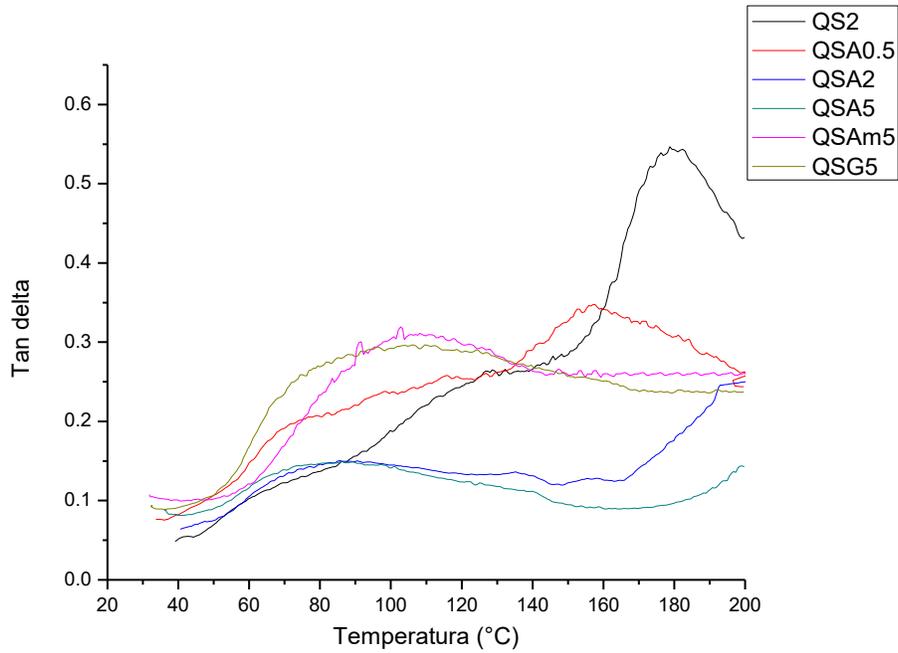


Figura 3.41 Temperatura de transición vítrea (Tg) comparativo QS2 vs. QSA0.5, QSA2, QSA5, QSAm5 y QSG5.

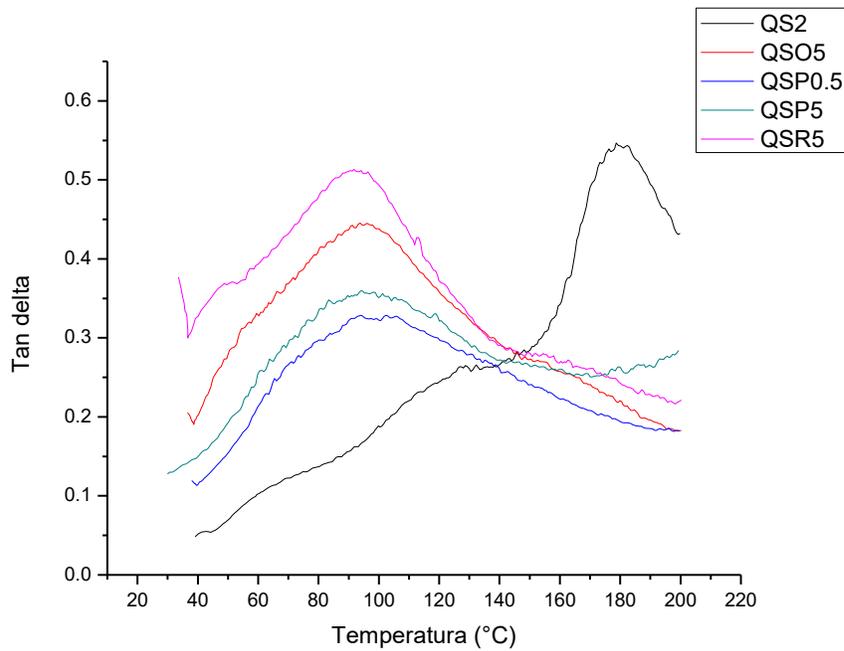


Figura 3.42 Temperatura de transición vítrea (Tg) comparativo QS2 vs. QSO5, QSP0.5, QSP5 y QSR5.

3.12 Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la figura 3.43 se muestran los termogramas TGA de las películas QSA_m2, QSA_m5, QSB2, QSB5, QSO5 y QSP0.5. En cada curva TGA se presentan varias pérdidas de peso o eventos térmicos. La primera pérdida de peso comprende desde la temperatura inicial hasta 135 °C aproximadamente y está asociada con la remoción de humedad y materiales volátiles, incluso la degradación de los antioxidantes debe ocurrir al final de esta pérdida de peso [135,137]. La segunda pérdida de peso ocurre entre 135 y 320 °C, se atribuye a la descomposición de las unidades amino del quitosano y la plastificación del almidón, así como a la descomposición del glicerol (la cual ocurre a 290 °C) [135,137]. La tercera pérdida ocurre entre 320 y arriba de los 400 °C, está relacionada con la descomposición del grupo -CH₂OH [135,137]. La degradación total de los anillos de quitosano y almidón sucede a los 600 °C [135,137]. Las muestras QSA_m2 y QSA_m5, en comparación con las demás muestras, presentan un mayor desplazamiento en final de la curva, lo que podría indicar una mayor plastificación en los materiales con arándano morado, estos materiales también presentan menores pérdidas totales de peso. Todas las curvas presentan una misma forma inicial causada por la acetilación del material, con excepción de QSO5 y presenta una de las menores pérdidas totales de peso [96] [135] [137-139].

En la curva TGA de la película QSA_m2 se observa una primera pérdida de peso de 10.21% a 135 °C. Se observa una segunda pérdida de peso de 57.71% a 320 °C. Se observa una pérdida final de peso de 90.52% a 600 °C. En la curva TGA de la película QSA_m5 se observa una primera pérdida de peso de 9.81% a 135 °C. Se observa una segunda pérdida de peso de 53.78% a 320 °C. Se observa una pérdida final de peso de 88.57% a 600 °C. En la curva TGA de la película QSB2 se observa una primera pérdida de peso de 8.26% a 135 °C. Se observa una segunda pérdida de peso de 55.29% a 320 °C. Se observa una pérdida final de peso de 96.52% a 600 °C. En la curva TGA de la película QSB5 se observa una primera pérdida de peso de 7.21% a 135 °C. Se observa una segunda pérdida de peso de 51.42% a 320 °C. Se observa una pérdida final de peso de 97.46% a 600 °C. En la curva TGA de la película QSO5 se observa una primera pérdida de peso de 17.92% a 135 °C. Se observa una segunda pérdida de peso de 65.79% a 320 °C. Se observa una pérdida final de peso de 90.51% a 600 °C. En la curva TGA de la película QSP0.5 se observa una primera

pérdida de peso de 9.22% a 135 °C. Se observa una segunda pérdida de peso de 59.78% a 320 °C. Se observa una pérdida final de peso de 96.05% a 600 °C.

De las películas analizadas mediante TGA, QSA m2, QSA m5 y QSO5 tienen menores pérdidas de peso finales y presentaron una buena actividad antimicrobiana, ver sección 3.2. Estos resultados son positivos, ya que estos materiales no sólo son materiales antimicrobianos sino que también son más estables ante la temperatura, lo que hace de estos candidatos promisorios para aplicaciones alimentarias. De acuerdo con los resultados en la primera pérdida de peso, deducimos que los extractos naturales de betabel, arándano morado y pitaya son más estables que el orégano. Esto coincide con el hecho de que las antocianinas y betalainas tienen mayor estabilidad ante los cambios de temperatura en comparación con el timol y carvacrol. Un comportamiento similar fue observado por Espitia y col. (2014), quienes encontraron que la adición de extracto de fenoles de piel de manzana y de acai da más estabilidad térmica a las películas comestibles [105]. Bof y col. (2016) observaron que la adición de extracto de semilla de uva otorgó a las películas de almidón de maíz-quitosano más estabilidad térmica que el aceite esencial de limón [140].

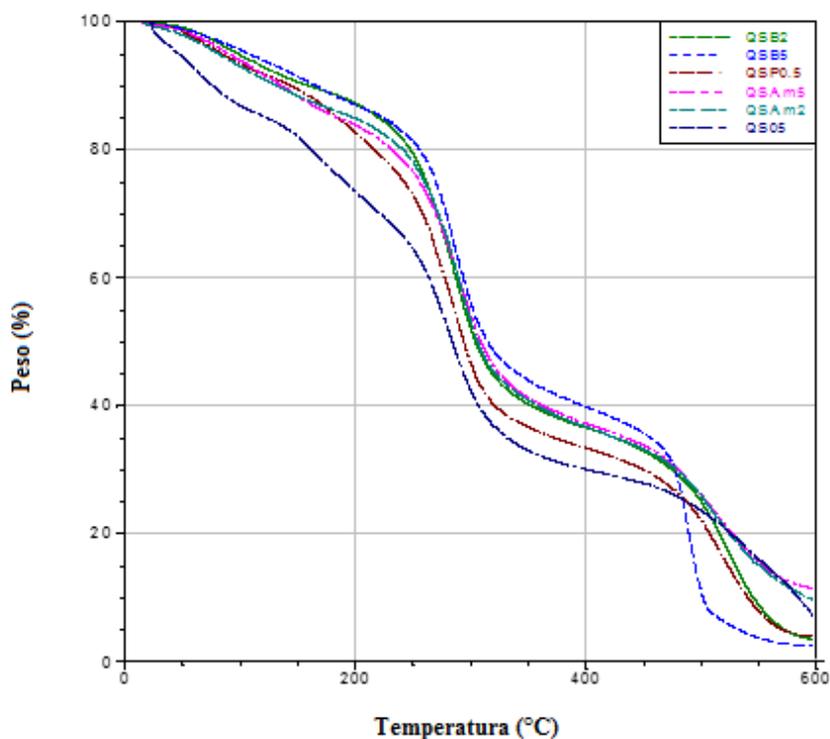


Figura 3.43 Termogramas de QSA m2, QSA m5, QSB2, QSB5 y QSO5.

Capítulo 4.0 Conclusiones

En las pruebas previas contra los microorganismos se encontraron que las películas QSA0.5, QSA2, QSAm2, QSAm5, QSB2, QSB5, QSG2, QSO0.5, QSP2, QSR0.5, QSR2, QSR5 dieron excelentes resultados contra los microorganismos presentes en el medio ambiente.

En las pruebas antimicrobianas las películas con 2 y 5% de extracto (v/v) tuvieron una buena actividad antimicrobiana en 4 o más de las 6 pruebas realizadas en cada grupo de microorganismos (cabe señalar que estas películas son las que presentaron menores valores de pH), con excepción de la pitaya donde la más efectiva fue aquella que contenía sólo el 0.5% (v/v) de extracto; sin embargo, sólo las películas QSA5, QSAm5, QSO5 inhibieron a los tres grupos. Esto es atribuido al hecho de que las antocianinas, el timol y el carvacrol tienen propiedades antimicrobianas y presentan una mayor estabilidad en su estructura ante diversos factores como la temperatura y el pH en comparación con otro tipo de antioxidantes. Se observó una relación entre la efectividad antimicrobiana y las cantidades de extracto o jugo utilizado.

Las películas con extractos naturales presentan mejores propiedades ópticas que QS2 (al tener un mayor espesor que ésta). En todas las pruebas las películas con 2 y 5% de extracto (v/v) demostraron tener las mejores propiedades ópticas. De nuevo observamos que las mayores cantidades de extractos mejoran las propiedades de las películas.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis FTIR realizados a las muestras, se concluyó que sólo es posible suponer la presencia de los antioxidantes en las películas, ya que los espectros IR mostraron una banda característica correspondiente al estiramiento a 3420 cm^{-1} es más ancha en comparación con la del espectro de QS2, esto indica que tenemos presencia de múltiples compuestos (y los extractos poseen compuestos diversos tales como azúcar, agua, ácidos carboxílicos, antioxidantes, azúcares, etc.). Esto se pudo relacionar con el ancho de la curva donde se ubica la Tg, lo que indica la presencia de diversos compuestos en nuestros materiales.

Como pruebas confirmatorias de la presencia de antioxidantes naturales tenemos los resultados obtenidos en los análisis antimicrobianos, la observación de la coloración de las películas, el espesor de las películas, así como en la Espectroscopía UV-vis y los cambios en las propiedades mecánicas de las películas. A través de los análisis Raman sólo podemos deducir que tenemos un material orgánico mayoritariamente amorfo que presenta fluorescencia.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis SEM realizados a las muestras, se concluyó que en las películas analizadas no existe una relación entre la cantidad de extractos agregados y la morfología de las películas, así como las propiedades antimicrobianas.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis UV-vis realizados a las muestras, se concluyó que las películas presentan picos característicos a 260-275 nm (se observa desplazamientos hipsocrómicos en todos los casos) que indican la presencia de los antioxidantes naturales en cantidades pequeñas (no existe diferencias significativas entre las cantidades). Se observa que la cantidad de extracto tiene relación con la actividad antimicrobiana.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis DMA realizados a algunas muestras, se concluyó que las películas QSA0.5, QSA5, QSG5 y QSP0.5 tienen óptimos valores de módulo de almacenamiento, ya que son más flexibles que QS2 y no presentan la viscosidad que tienen QSO5, QSP5 y QSR5. Las películas presentan menor Tg o temperatura de trabajo que QS2, pero tienen temperaturas óptimas para su uso en embalaje de alimentos (superiores a 80 °C).

Con base en los resultados obtenidos en los análisis TGA realizados a algunas muestras, se concluyó que las películas QSAm2, QSAm5 y QSO5 tienen menores pérdidas de peso. Se demuestra de nuevo que a mayor cantidad de extracto, mejores propiedades tiene la película.

Considerando todos los resultados presentados, se considera que las mejores películas para ser utilizadas como embalajes de alimentos, debido a que inhiben los microorganismos e inhiben la oxidación lipídica proporcionando una posibilidad de mayor

vida útil de un alimento, son aquellas que tiene 2 y 5% de extracto, con excepción de la pitaya donde la mejor es aquella que tiene el 0.5% de extracto.

También podemos concluir que se cumple con la hipótesis, la justificación, así como el objetivo general del proyecto al sintetizar nuevos materiales biocidas que refuerzan el conocido efecto biocida de la mezcla quitosano-almidón y mejorando al mismo tiempo sus propiedades mecánicas, térmicas y ópticas, dando materiales óptimos para embalajes de alimentos que son 100% biodegradables, no tóxicos y con costos de producción más baratos.

Las películas presentan diversa morfología, pero no se presenta relación contundente entre éstas y las propiedades antimicrobianas de las películas; por otro lado, la adición de extractos hace que las películas de quitosano-almidón sean más flexibles y presentan una buena temperatura de trabajo, y se observa que los extractos (especialmente aquellos que contienen antocianinas) confieren a las películas mayor estabilidad térmica. Se obtuvieron películas con distintas coloraciones y propiedades que pueden ser empleadas como materiales en la industria de alimentos, siendo éstas capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos que provocan la descomposición de alimentos.

Esto demuestra que es cierta la hipótesis que indica que la adición de extractos que contienen antioxidantes naturales mejora ampliamente las propiedades de las películas de quitosano-almidón, cumpliéndose que todos los objetivos de esta investigación. Se encontró que estos materiales no son tóxicos y su síntesis es barata en consideración con otros métodos de obtención de antioxidantes que presentan resultados similares.

Referencias

- [1] T. Qian; H. Su; T. Tan; The bactericidal and mildew-proof activity of a TiO₂-chitosan composite, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 218 , Núm. 1, 2011, pág. 130–136.
- [2] K. M. Kim; J. H. Son; S.-K. Kim; C. L. Weller; M. A. Hanna; Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type, *Journal of Food Science E: Food Engineering and Physical Properties*, Vol. 71, Núm. 3, 2006, pág. 119–124.
- [3] Y. Xu; K. M. Kim; M. A. Hanna; D. Nag; Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization, *Industrial Crops and Products*, Vol. 21, Núm. 2, 2005, pág. 185–192.
- [4] J. Dai; R. J. Mumper; Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties; *Molecules*, Vol. 15, Núm. 10, 2010, pág. 7314-7316.
- [5] A. N. Hernández-Lauzardo; S. Bautista-Baños; M. G. Velázquez-del Valle; G. Méndez-Montevalvo; M. M. Sánchez-Rivera; L. A. Bello-Pérez; Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.Fr.) Vuill, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 73, Núm. 4, 2008, pág. 541–547.
- [6] S. Y. Park; K. S. Marsh; J. W. Rhim; Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents, *Food Engineering and Physical Properties*, Vol. 67, Núm. 1, 2002, pág. 194-197.
- [7] W. Tiyaboonchai; Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery, *Naresuan University Journal*, Vol. 11, Núm. 3, 2003, pág. 51-66.
- [8] M. Hernández-Medina, J. G. Torruco-Uco; L. Chel-Guerrero; D. Betancur-Ancona; Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México, *Ciencia e Tecnología de Alimentos*, Vol. 28, Núm. 3, 2008, pág. 718-726.

- [9] S. Badui; Química de los alimentos, Alhambra Mexicana S. A. de C. V., 3.- edición, México, 1993, pág. 397-398.
- [10] L. Mayer; Métodos en la industria química Parte 2: Orgánica, Editorial Reverté, España, 1987, pág. 86-87.
- [11] L. Hernández Nazario; M. M. Quintana Cabrales; H. J. Morris Quevedo; Obtención de Glicerol a partir de la microalga *Dunaliella Salina*, Revista Cubana de Farmacia, Vol. 34, Núm. 2, 2000, pág. 134-137.
- [12] M. Pagliaro; R. Ciriminna; H. Kimura; M. Rossi; C. Della Pina; From Glycerol to Value-Added Products, Angewandte Chemie International Edition, Vol. 46, Núm. 24, 2007, pág. 4434-4440.
- [13] M. Lavorgna; F. Piscitelli; P. Mangiacapra; G. G. Buonocore; Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films, Carbohydrate Polymers, Vol. 82, Núm. 2, 2010, pág. 291–298.
- [14] M. V. Garrido; Arándano rojo I (*Vaccinium macrocarpon* Ait.), Reduca (Biología). Serie Botánica, Vol. 7, Núm. 2, 2014, pág. 100-112.
- [15] Autores varios, Arándano | Propiedades | Frutas | CONSUMER EROSKI, <http://frutas.consumer.es/arandano/propiedades>
- [16] Autores varios, Enciclopedia Universal Ilustrada Tomo 4, ESPASA-CALPE S.A., 3.- edición, España, 2000, pág. 352.
- [17] Autores varios, Enciclopedia Universal Ilustrada, Tomo 50, ESPASA-CALPE S.A., 1.- edición, España, 1979 pág. 742-746.
- [18] P. C. Wootton-Beard; L. Ryan; A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants, Journal of functional foods, Vol. 3, Núm. 4, 2011, pág. 329-334.

[19] Autores varios, Remolacha | Introducción | Hortalizas y verduras | CONSUMER EROSKI <http://verduras.consumer.es/remolacha/introduccion>

[20] A. Chebaibi; F. R. Filali; Bactericidal activity and phytochemical screening of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* Linn.) peel aqueous extracts, *Journal of Medicinal Plants Research, Academic Journals*, Vol. 7, Núm. 14, 2013, pág. 887-891.

[21] E. Colombo; E. Sangiovanni; M. Dell'agli; A Review on the Anti-Inflammatory Activity of Pomegranate in the Gastrointestinal Tract, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2013, 2013, pág. 1-11.

[22] Autores varios, <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/granada.pdf>

[23] R. D. Santos; K. Shetty; A. L. Cecchini; L. H. da Silva Miglioranza; Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread, *Ciências Agrárias*, Vol. 33, Núm. 2, 2012, pág. 655-665.

[24] Y. I. Delgado García; J. G. Báez-González; M. A. Núñez González; C. L. García-Díaz; C. A. Amaya-Guerra; D. J. Pimentel-González; Determinación de la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*poliomintha longiflora* gray), *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2010, pág. OT161-1 a OT161-7.

[25] Autores varios, Información nutricional del Orégano seco, calorías, composición y valores nutricionales, <http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional-de/oregano-seco/>

[26] F. Zee; C.-R. Yen; M. Nishina; Pitaya (Dragon Fruit, Strawberry Pear), *Fruits and Nuts*, Vol. 9, 2004, pág. 1-3.

[27] A. Rodríguez Canto; Producción y Comercialización de Pitahayas en México, *Revista Abriendo surcos*, pág. 3-44.

[28] Botanical-online S.L., Valor nutricional de la fruta del dragón, http://www.botanical-online.com/pitahaya_valor_nutricional.htm

[29] A. Reyes Munguía; M. T. Galicia Cardoso; M. L. Carrillo Inungaray; Antioxidantes: La magia de lo natural, Tlatemoani Revista Científica de Investigación, Núm. 8, 2011, pág. 4-6.

[30] R. Ocampo; L. A. Ríos; L. A. Betancur; D. M. Ocampo; Curso práctico de química orgánica, Editorial Universidad de Caldas, primera edición, 2008, pág. 56-58.

[31] V. F. Marañón-Ruiz; R. Chiu-Zarate, L. del C. Rizo de la Torre, Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía Uv-Vis y barrido en Z, Superficies y Vacío, Vol. 24, Núm. 4, 2011, pág. 113-120.

[32] Autores varios, Enciclopedia Universal Ilustrada Tomo 59, ESPASA-CALPE S.A., 3.- edición, España, 2000, pág. 1125.

[33] A. Ultee; R. A. Slump; G. Steging; Eddy J. Smid; Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice, Journal of Food Protection, International Association for Food Protection, Vol. 63, Núm. 5, 2000, pág. 620–624.

[34] J. Gambini; R. López-Grueso; G. Olaso-González; M. Inglés; K. Abdelazid; M. El Alami; V. Bonet-Costa; C. Borrás; J. Viña; Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas, Revista Española de Geriatria y Gerontología, Vol. 48 Núm. 2, 2013, pág. 79–88.

[35] R. Granados Pérez; C. Villaverde Peris; Microbiología Tomo 1, Thompson Paraninfo, 3.- reimpresión, España, 2003, pág. 3-17.

[36] P. Carpenter; Microbiología, Nueva Editorial Interamericana S. A. de C.V., 2.- edición, México, 1977, pág. 144-145, 150-157, 218, 334-335, 376.

[37] F. S. Thatcher; D. S Clark; Análisis microbiológico de los alimentos, Acribia, 1.- edición, España, 1973, pág. 31-33.

[38] D. Fatemeh; M. R. Zolfaghari; M. Arjomandzadegan; K. Salomeh; A. G. Reza; S. Hossein; S. Maryam; A. Ahmadi; M. Shojapuor; N. Negin; K. A. Reza; F. Saeed; Rapid

detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture (Most Probable Number), *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. 4, Núm. 5, 2014, pág. 404-409.

[39] G. Prats; *Microbiología clínica*, Editorial Médica Panamericana, 1.- Reimpresión, 2008, pág. 83-84.

[40] J. Pontón; M. D. Moragues; J. Gené; J. Guarro; G. Quindós; *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol. 19, 2002, pág. 22-23.

[41] E. Schuster; N. Dunn-Coleman; J. C. Frisvad; P. W. M. Van Dijck; On the safety of *Aspergillus niger* - A review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 59, Núm. 4-5, 2002, pág. 426–435.

[42] M. Carochi; I. C. F. R. Ferreira; A review on- antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 51, 2013, pág. 15–25.

[43] C. López-Alarcón; A. Denicola; Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 763, 2013, pág. 1– 10.

[44] H. A. Abd El-Rehim; N. M. El-Sawya; A. H. El-Sayed; A. S. El-Sayed; A. M. Elbarbarya; Improvement of antioxidant activity of chitosan by chemical treatment and ionizing radiation, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 50, Núm. 2, 2012, pág. 403– 413.

[45] Y. Yu; S. Zhang; Y. Ren; H. Li; X. Zhang; J. Di; Jujube preservation using chitosan film with nano-silicon dioxide, *Journal of Food Engineering*, Vol. 113, Núm. 3, 2012, pág. 408–414.

[46] H. Ai; F. Wang; Y. Xi; X. Chen; C. Lei; Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L.; *Food Chemistry*, Vol. 132, Núm.1, 2012, pág. 493–498.

[47] Y. Ruiz-Navajas; M. Viuda-Martos; E. Sendra; J. A. Pérez-Álvarez; J. Fernández-López; In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils, *Food Control*, Vol. 30, Núm., 2, 2013, pág. 386-392.

[48] C. Pastor; L. Sánchez-González; A. Chiralt; M. Cháfer; C. González-Martínez; Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol, *Food Hydrocolloids*, Vol. 30, Núm. 1, 2013, pág. 272-280.

[49] X.-P. Zhang; Y. Le; J.-X. Wang; H. Zhao; J.-F. Chen; Resveratrol nanodispersion with high stability and dissolution rate; *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 50, Núm. 2, 2013, pág. 622-628.

[50] G. Spigno; F. Donsì; D. Amendola; M. Sessa; G. Ferrari; M. D. De Faveri; Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste, *Journal of Food Engineering*, Vol. 114, Núm. 2, 2013, pág. 207–214.

[51] Y. Zhong; X. Song; Y. Li; Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as function of acid solvent types, Vol. 84, Núm. 1, 2011, pág. 335-342.

[52] M. Matet; M.-C. Heuzey; E. Pollet; A. Aji; L. Avérous; Innovative thermoplastic chitosan obtained by thermo-mechanical mixing with polyol plasticizers, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 95, Núm. 1, 2013, pág. 241-251.

[53] S. Mathew; T. E. Abraham; Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films, *Food hydrocolloids*, Vol. 22, Núm. 5, 2008, pág. 826-835.

[54] M. Liu; Y. Zhou; Y. Zhang; C. Yu; S. Cao; Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol, *Food hydrocolloids*, Vol. 33, Núm. 2, 2013, pág. 186-191.

[55] C. L. Torres-Delgado; N. P. Diaz-Zavala; C. Velasco-Santos; P. Salas, A. L. Martinez-Hernandez; Synthesis and Characterization of chitosan-starch films reinforced with TiO₂ nanoparticles, *Memorias del XIX International Material Research Congress*, Mexico, 2010.

[56] E. Parente; C. Brienza; M. Moles; A. Ricciardi; A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 22, Núm. 1, 1995, pág. 95-108.

[57] Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en placa, *Diario Oficial de la Nación*, Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, México, 1995.

[58] Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en placa, *Diario Oficial de la Nación*, Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, México, 1995.

[59] Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en Alimentos, *Diario Oficial de la Nación*, Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, México, 1995.

[60] Comité de expertos en antibióticos; Unificación de métodos para las pruebas de sensibilidad microbiana, *Organización Mundial de la Salud*, No. 210, Suiza, 1961, p. 13-17.

[61] I. Leceta; P. Guerrero; K. de la Caba; Functional properties of chitosan-based films, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 93, Núm. 1, 2013, pág. 339–346.

[62] S. R. Kanatt; M. S. Rao; S. P. Chawla; A. Sharma; Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts, *Food Hydrocolloids*, Vol. 29, Núm. 2, 2012, pág. 290-297.

- [63] ASTM D 6739 Standard Test Method for Silica—pH Value, 2015.
- [64] NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas., 1978.
- [65] S. Ahmed; S. Ikram; Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, Vol. 163, 2016, pág. 115–124.
- [66] J. H. Han; J. D. Floros; Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity, *Journal of Plastic Film and Sheeting*, Vol. 13, Núm. 4, 1997, pág. 287-298.
- [67] N. Gontard; S. Guilbert; J.-L. Cuq; Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology, *Journal of Food Science*, Vol. 57, Núm. 1, 1992, pág. 190-199.
- [68] Autores varios, *Characterization analysis of polymers*, Wiley-Interscience, Estados Unidos, 2008, pág. 89-90, 100.
- [69] T. Owen; *Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna*, Agilent Technologies, Alemania, 2000, pág. 2-5, 10-14, 31-32.
- [70] K. K. Adom; R. H. Liu; Antioxidant Activity of Grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, Núm. 21, 2002, pág. 6183-6187.
- [71] V. L. Singleton; J. A. Rossi Jr.; Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 16, 1965, pág. 144–158.
- [72] Y. Y. Lim; L. Theng; T. Tee; J. J. Tee; Antioxidant Properties of Guava Fruit: Comparison with some local fruits, *Sunway Academic Journal*, Vol. 3, 2006, pág. 9–20.

[73] Y. Y. Lim; T. T. Lim; J. J. Tee; Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study, *Food Chemistry*, Vol. 103, Núm. 3, 2007, pág. 1003–1008.

[74] F. Pourmorad; S. J. Hosseinimehr; N. Shahabimajd; Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5, Núm. 11, 2006, pág. 1142-1145.

[75] S. McDonald; P. D. Prenzler; M. Autolovich; K. Robards; Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts, *Food Chemistry*, Vol. 73, Núm. 1, 2001, pág. 73-84.

[76] A. Lamien-Meda; C. E. Lamien; M. Romito, J. F. Millogo; O. G. Nacoulma; Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, Vol. 91, Núm. 3, 2005, pág. 571–577.

[77] C. Vasco; J. Ruales; A. Kamal-Eldin; Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador, *Food Chemistry*, Vol. 111, Núm. 4, 2008, pág. 816–823.

[78] <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6887/03Rpp03de11.pdf>

[79] V. Sorrivás de Lozano; M. J. Yañez; A. Morales; Principios y Práctica de la microscopía electrónica, 1.- edición, 2014, pág. 83-88.

[80] H. H. Willard; Métodos instrumentales de análisis, Grupo Editorial Iberoamérica, 7.- edición, México, 1991, p. 753-755.

[81] E. Koneman; S. Allen; Diagnostico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana, 1.- edición, Argentina, 1983, p. 108-111.

[82] R. E. Wrolstad; R. W. Durst; J. Lee; Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 16, Núm 9, 2005, pág. 423–428.

[83] F. Delgado-Vargas; A. R. Jiménez; O. Paredes-López; Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 40, Núm. 3, 2000, pág. 173-289.

[84] P. A. E. Wesche-Ebeling; Purification of strawberry polyphenol oxidase and its role in anthocyanin degradation, *Dissertation Abstracts International*, Vol. 44, 1984, pág. 1-180.

[85] C. E. Lewis; J. R. L. Walker; Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins, *Food Chemistry*, Vol. 54, Núm. 3, 1995, pág. 315-319.

[86] B. C. Trela; A. L. Waterhouse; Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44, Núm. 5, 1996, pág. 1253–1257.

[87] G. A. Wistreich; M. D. Lechtman; *Prácticas de laboratorio en Microbiología*, Editorial Limusa, 2.- edición, México, 1989.

[88] E.-R; Kenawy; S. D. Worley; R. Broughton; The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state of the Art Review, *Biomacromolecules*, Vol. 8, No. 5, 2007, pág. 953-962.

[89] F. M. Pelissari; M. V. E. Grossmann; F. Yamashita; E. A. G. Pineda; Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 57, Núm. 16, 2009, pág. 7499–7504.

[90] P. Fernandez-Saiz; José María Lagaron; M.J. Ocio; Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area, *Food Hydrocolloids*, Vol. 23, Núm. 3, 2009, pág. 913–921.

[91] M. Duran; M. S. Aday; N. N. D. Zorba; R. Temizkan; M. B. Büyükcan; C. Caner; Potential of Antimicrobial Active Packaging Containing Natamycin, Nisin,

Pomegranate and Grape Seed Extract in Chitosan Coating to Extend Shelf Life of Fresh Strawberry, *Food Bioproduction Process*, Vol. 98, 2016, pág. 354–363.

[92] G. Yuan; H. Lv; W. Tang; X. Zhang; H. Sun; Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage, *Food Control*, Vol. 59, 2016, pág. 818-823.

[93] A. Paparella; G. Mazzarrino; C. Chaves-Lopez; C. Rossi; G. Sacchetti; O. Guerrieri; A. Serio; Chitosan boosts the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil in modified atmosphere packaged pork, *Food Microbiology*, Vol. 59, 2016, pág. 23-31.

[94] X. L. Shen; J. M. Wu; Y. Chen; G. Zhao; Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan, *Food Hydrocolloids*, Vol. 24, Núm. 4, 2010, pág. 285–290.

[95] Y. Pranoto; S. K. Rakshit; V. M. Salokhe; Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin, *LWT – Food Science and Technology*, Vol. 38, Núm. 8, 2005, pág. 859–865.

[96] A. P. Martínez-Camacho; M. O. Cortez-Rocha; J. M. Ezquerria-Brauer; A. Z. Graciano-Verdugo; F. Rodríguez-Félix; M. M. Castillo-Ortega; M. S. Yépez-Gómez; M. Plascencia-Jatomea; Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 82, Núm. 2, 2010, pág. 305–315.

[97] M. Plascencia-Jatomea; G. Viniegra; R. Olayo; M. M. Castillo-Ortega; K. Shirai; Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 3, Núm. 10, 2003, pág. 582–586.

[98] H. Ture; E. Eroglu; B. Ozen; F. Soyer; Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese, *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 46, 2011, pág. 154–160.

[99] C. Lárez Velásquez; Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica, Revista UDO Agrícola, Vol. 8, Núm. 1, 2008, pág. 1-22.

[100] V. C.H. Wu; X. Qiu; B. G. de los Reyes; C.-S. Lin; Y. Pan; Application of cranberry concentrate (*Vaccinium macrocarpon*) to control *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and its antimicrobial mechanism related to the downregulated *slp*, *hdeA* and *cfa*, Food Microbiology, Vol. 26, Núm. 1, 2009, pág. 32–38.

[101] R. M. García-García; E. Palou-García; Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos, Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, Vol. 2, Núm. 2, 2008, pág. 41 – 51.

[102] M. Mora-Pale; N. Bhan; S. Masuko; P. James; J. Wood; S. McCallum; R. J. Linhardt; J. S. Dordick; M. A. G. Koffas; Antimicrobial Mechanism of Resveratrol-transDihydrodimer Produced From Peroxidase Catalyzed Oxidation of Resveratrol, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 112, Núm. 12, 2015, pág. 2417-2428.

[103] S. Benavides; R. Villalobos-Carvajal; J. E. Reyes; Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration, Journal of Food Engineering, Vol. 110, Núm. 2, 2012, pág. 232–239.

[104] Y.-Y. Qin; Z.-H. Zhang; L. Li; M.-L. Yuan; J. Fan; T.-R. Zhao; Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind, Journal of Food Science and Technology, Vol. 52, Núm. 3, 2015, pág. 1471–1479.

[105] P. J. P. Espitia; R. J. Avena-Bustillos; W.-X. Du; B.-S. Chiou; T. G. Williams; D. Wood; T. H. McHugh; N. F. F. Soares; Physical and Antibacterial Properties of Acai Edible Films Formulated with Thyme Essential Oil and Apple Skin Polyphenols, Journal of Food Science, Vol. 79, Núm. 5, 2014, pág. M903-M910.

[106] Autores varios, Densidad aparente, <http://araucarias.blogspot.mx/2005/09/densidad-aparente.html>

[107] Autores varios, Escorrentía subterránea Porosidad y permeabilidad, https://pendientedemigracion.ucm.es/info/dicix/proyectos/agua/esc_sub_porosidad.html

[108] Š. Zupančič; Z. Lavrič; J. Kristl; Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 93, 2015, pág. 196-204.

[109] J. Lee; R. W. Durst; R. E. Wrolstad; Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study, *Journal of AOAC International*, Vol. 88, Núm 5, 2005, pág. 1269-1278.

[110] C. Amadio; M. É. Zimmermann; R. Medina; S. Miralles; C. Dediol; Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario, *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, Vol. 43, Núm. 1, 2011, pág. 237-245.

[111] D. Gupta; D. Singh; N. C. Kothiyal; A. K. Saini; V. P. Singh; D. Pathania; Synthesis of chitosan-g-poly(acrylamide)/ZnS nanocomposite for controlled drug delivery and antimicrobial activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 74, 2015, pág. 547–557.

[112] M. del R. Moreira; M. Pereda; N. E. Marcovich; S. I. Roura; Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami, *Journal of Food Science.*, Vol. 76, Núm. 1, 2011, pág. M54-M63.

[113] G. Porras; M. Calvo; M. Esquivel; M. Sibaja; S. Madrigal-Carballo; Quitosano n-acilado con cinamaldehido: un potencial biopláguica contra agentes patógenos en el campo agrícola, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 10, Núm. 3, 2009, pág. 198-199.

[114] H. Hernández Cocolletzi; E. Águila Almanza; O. Flores Agustín; E. L. Viveros Nava; E. Ramos Cassellis; Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón, *Superficies y Vacío*, Vol. 22, Núm. 3, 2009, pág. 57-60.

[115] C. Tangsadthakun; S. Kanokpanont; N. Sanchavanakit; R. Pichyangkura; T. Banaprasert; Y. Tabata; S. Damrongsakkul; The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, Vol. 18, Núm. 2, 2007, pág. 147–163.

[116] Z. Limam; S. Selmi; S. Sadok; A. El Abed; Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10, Núm. 4, 2011, pág. 640-647.

[117] L. C. Tomé; S. C. M. Fernandes; P. Sadocco; J. Causio; A. J. D. Silvestre; C. Pascoal Neto; C. S. R. Freire; Antibacterial thermoplastic starch-chitosan based materials prepared by melt-mixing, *Bioresources*, Vol. 7, Núm. 3, 2012, pág. 3398-3409.

[118] M. Jaworska; K. Sakurai; P. Gaudon; E. Guibal; Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. *Polymer International*, Vol. 52, Núm. 2, 2003, pág. 198–205.

[119] C. Rodríguez-Gonzalez; A. L. Martínez-Hernandez; V. M. Castaño; O. V. Kharissova; R. S. Ruoff; C. Velasco-Santos; Polysaccharide Nanocomposites Reinforced with Graphene Oxide and Keratin-Grafted Graphene Oxide, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Vol. 51, Núm. 9, 2012, pág. 3619–3629.

[120] M. del P. Guzmán-Figueroa; A. E. Ortega-Regules; C. Anaya-Barrios; Piranoantocianinas: modificaciones estructurales de las antocianinas, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 1, Núm. 4, 2010, pág. 84-95.

[121] M. C. Pessanha de Araújo; A. C. M. Senna; R. L. de Oliveira; R. Galhardo; S. Pacheco; R. S. Nogueira; L. da Silva de Mattos; Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC, *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol. 17, Núm. 1, 2014, pág. 51-57.

[122] K. Ayala; M. del C. Beltrán; Determinación e Identificación Parcial del Contenido de Pigmentos Betalainas en la Pulpa de Cuatro Variedades de Pitaya *Stenocereus griseus* H., Memorias IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, México, 2007.

[123] A. Espíndola-González; A. L. Martínez-Hernández; F. Fernández-Escobar; V. M. Castaño; W. Brostow; T. Datashvili; C. Velasco-Santos; Natural-Synthetic Hybrid Polymers Developed via Electrospinning: The Effect of PET in Chitosan/Starch System, *International Journal of Molecular Science*, Vol. 12, Núm. 3, 2011, pág. 1908-1920.

[124] A. C. Ferrari; Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects, *Solid State Communications*, Vol. 143, Núm. 1-2, 2007, pág. 47-57.

[125] A. C. Ferrari; J. Robertson; Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon, *Physical Review B Condensed Matter*, Vol. 61, Núm. 20, 2000, pág. 14095-14107.

[126] E. Salleh; I. I. Muhamad; N. Khairuddin; Structural Characterization and Physical Properties of Antimicrobial (AM) Starch Based Films, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, Vol. 3, Núm. 7, 2009, pág. 352-360.

[127] S. Mathew; M. Brahmakumar; T. E. Abraham; Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal and swelling properties of starch-chitosan blend films, *Biopolymers*, Vol. 82, Núm. 2, 2006, pág. 176-187.

[128] F. A. Al-Sagheer; S. Shetranjiwalla-Merchant; Visco-elastic properties of chitosan-titania nano-composites, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 85, Núm. 2, 2011, pág. 360-361.

[129] M. F. Domínguez-Courtney; M. T. Jiménez-Munguía; Películas formuladas con polisacaridos: Propiedades y aplicaciones, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 6, Núm. 2, 2012, pág. 110-121.

[130] J. Bonilla; L. Atarés; M. Vargas; A. Chiralt; Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films, *Food Hydrocolloids.*, Vol. 26, Núm. 1, 2012, pág. 9-16.

[131] W. Albarracín-Hernández; N. Valderrama-Bohórquez; Inclusión de compuestos químicos en matrices poliméricas de quitosano y su efecto en las propiedades de película, *Vitae*, Vol.21, Núm.1, 2014, pág. 49-59.

[132] K. Sakurai; T. Maegawa; T. Takahashi; Glass transition temperatura of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends, *Polymer*, Vol. 41, Núm. 19, 2000, pág. 7050-7055.

[133] M. K. Cheung; K. P. Y. Wan; P. H. Yu; Miscibility and morphology chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, ^1H T₁ and T_{1ρ} CRAMPS. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 86, Núm. 5, 2002, pág. 1253–1258.

[134] N. Jacquel; C.-W. Lo; Y.-H. Wei; H.-S. Wu; Shaw S. Wang; Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates), *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 39, Núm. 1, 2008, pág. 15–27.

[135] J. Mina; A. Valadez-González; P. Herrera-Franco; S. Delvasto; Caracterización fisicoquímica del almidón termoplástico de yuca natural y acetilada, *Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín*, Año 78, No. 166, 2011, pág. 166-173.

[136] P. Markakis; L. Jurd; Anthocyanins and their stability in foods, *C R C Critical Reviews in Food Technology*, Vol. 4, Núm. 4, 1974, pág. 437-456.

[137] L. Benavides Rodríguez; M. Sibaja Ballesteros; J. Vega-Baudrit; M. Camacho Elizondo; S. Madrigal Carballo; Estudio Cinético de la degradación térmica de Quitina y Quitosano de camarón de la especie “*Heterocarpus Vicarius*” empleando la técnica termogravimétrica en modo dinámico, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 11, Núm. 7, 2010, pág.561-562.

[138] D. Yang; J. Li; Z. Jiang; L. Lu; X. Chen; Chitosan/TiO₂ nanocomposite pervaporation membranes for ethanol dehydration, *Chemical Engineering Science*, Vol. 64, Núm. 13, 2009, pág. 3130-3137.

[139] M. J. O'Neil; *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Whitehouse Station NJ: Merck and Co., 2006, pág. 774.

[140] M. J. Bof; A. Jiménez; D. E. Locaso; M. A. García; A. Chiralt; Grapefruit Seed Extract and Lemon Essential Oil as Active Agents in Corn Starch–Chitosan Blend Films, *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 9, Núm. 12, 2016, pág. 2033–2045.

Anexo 1 Referencias de las imágenes pertenecientes a otros autores

| Clave | Figura | Referencia |
|-------|--------|---|
| A1 | 1.1. | http://uru.edu/fondoeditorial/revista/pdf/rtu/TCUn1/Quitina%20y%20quitosano.pdf |
| A2 | 1.2 | http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/almidon.html |
| A3 | 1.3 | http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos1.html |
| A4 | 1.4 | http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos1.html |
| A5 | 1.6 | https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_ac%C3%A9tico |
| A6 | 1.7 | https://kimiexplorer.wikispaces.com/Glicerol |
| A7 | 1.11 | https://es.wikipedia.org/wiki/Timol |
| A8 | 1.12 | http://www.agromatica.es/cultivo-de-ajedrea-en-el-huerto/ |
| A9 | 1.14 | Medical Microbiology, P. Murray. |
| A10 | 1.15 | http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas-1/practica-1-microorganismos-marcadores-recuento/skinless_view |
| A11 | 1.16 | http://test.bioser.com/ca/productes/page/20/?category=1&subcategory=1 |
| A12 | 1.17 | https://sites.google.com/site/bionewspanama/ |
| A13 | 1.18 | https://www.emaze.com/@AFTTTFQI/La-penicilina |
| A14 | 1.19 | http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100812 |
| A15 | 1.20 | http://laredsubterranea.blogspot.mx/2015/04/aspegillus-niger-el-secreto-mejor.html |

Anexo 2 Artículo Publicado

Título: Antimicrobial, Optical and Mechanical Properties of Chitosan–Starch Films with Natural Extracts

Autores: Jessica I. Lozano-Navarro; Nancy P. Díaz-Zavala; Carlos Velasco-Santos; Ana L. Martínez-Hernández; Beatriz I. Tijerina-Ramos; Margarita García-Hernández; José L. Rivera-Armenta; Ulises Páramo-García; Adriana I. Reyes-de la Torre.

Revista: International Journal of Molecular Sciences Special Issue Antimicrobial Polymers 2016.

Fecha de publicación: 5 de mayo de 2017

Volumen: 18, **Número:** 5, 18 páginas

DOI: 10.3390/ijms18050997

Open access: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/997>



Article

Antimicrobial, Optical and Mechanical Properties of Chitosan–Starch Films with Natural Extracts

Jessica I. Lozano-Navarro ^{1,*}, Nancy P. Díaz-Zavala ¹, Carlos Velasco-Santos ²,
Ana L. Martínez-Hernández ², Beatriz I. Tijerina-Ramos ¹, Margarita García-Hernández ¹,
José L. Rivera-Armenta ¹, Ulises Páramo-García ¹ and Adriana I. Reyes-de la Torre ¹

¹ Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, Centro de Investigación en Petroquímica, Prolongación Bahía de Aldair, Ave. de las Bahías, Parque de la Pequeña y Mediana Industria, Altamira, Tamaulipas C.P. 89600, Mexico; npatdiaz@hotmail.com (N.P.D.-Z.); betijerina@hotmail.com (B.I.T.-R.); margarita.garcia@itcm.edu.mx (M.G.-H.); jlriveraarmenta@itcm.edu.mx (J.L.R.-A.); uparamo@itcm.edu.mx (U.P.-G.); adriana.reyes@itcm.edu.mx (A.I.R.-d.l.T.)

² Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Querétaro, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Av. Tecnológico s/n esquina Gral. Mariano Escobedo, Col. Centro Histórico, Querétaro, Querétaro C.P. 76000, Mexico; cylaura@gmail.com (C.V.-S.); almh72@gmail.com (A.L.M.-H.)

* Correspondence: yukino_85@hotmail.com; Tel.: +52-833-3574820

Academic Editors: Antonella Piozzi and Iolanda Francolini

Received: 3 April 2017; Accepted: 26 April 2017; Published: 5 May 2017

Abstract: Natural extracts possess several kinds of antioxidants (anthocyanins, betalains, thymol, carvacrol, and resveratrol) that have also demonstrated antimicrobial properties. In order to study these properties, extracts from cranberry, blueberry, beetroot, pomegranate, oregano, pitaya, and resveratrol (from grapes) were obtained. Growth inhibition tests of mesophilic aerobes, coliforms, and fungi were conducted in films prepared from the extracts in accordance with Mexican Official Norms (NOM). Optical properties such as transparency and opacity, mechanical properties, and pH were also analyzed in these materials. The films with beetroot, cranberry, and blueberry extracts demonstrated the best antimicrobial activity against various bacteria and fungi in comparison with unmodified chitosan–starch film. This study shows that the addition of antioxidants improved the antimicrobial performance of these films. It was also found that antimicrobial properties are inherent to the films. These polymers combined with the extracts effectively inhibit or reduce microorganism growth from human and environmental contact; therefore, previous sterilization could be unnecessary in comparison with traditional plastics. The presence of extracts decreased transmittance percentages at 280 and 400 nm, as well as the transparency values, while increasing their opacity values, providing better UV–VIS light barrier properties. Despite diminished glass transition temperatures (T_g), the values obtained are still adequate for food packaging applications.

Keywords: chitosan–starch; natural extracts; antimicrobial activity; optical and mechanical properties

1. Introduction

In recent decades, human health has been increasingly threatened by microbiological contamination; this can be seen in the spread of food-borne infections and communicable diseases that has occurred recently. Therefore, it is necessary to find, develop, and improve antimicrobial natural materials capable of inhibiting the proliferation of various microorganisms. Several research studies have shown that chitosan and other several natural antioxidants are natural biocides that are promising candidates for solving this problem [1].

Chitosan is obtained by the *N*-deacetylation of chitin, which is the second most abundant natural polysaccharide in nature. Due to its good biocompatibility, it is widely applied in the pharmaceutical,

agricultural, food, nutritional, and biomedical industries, in addition to other applications such as sewage treatment. In recent years, the bactericidal and fungicidal features of chitosan have drawn wide attention [2]. Chitosan is not soluble in pure water or organic solvents, but it is soluble in aqueous solutions of organic or mineral acids. Chitosan-based materials can be used as degradable and edible films or coatings. Starch has been used to produce biodegradable films, partially or totally substituting plastic polymers, because of its low cost and renewability. However, the broad applications of pure starch films are limited by the water solubility and fragility of the material [3].

There are various antioxidant substances found naturally in foods that slow the oxidation reactions in cells from which harmful free radicals originate. Therefore, antioxidants play a key role in reducing cardiovascular disease, tumors, and neurodegenerative diseases. Furthermore, they strengthen the immune system. These substances have been studied in recent years because of their biocidal and antiseptic properties, as well as their abundance in nature [4]. Natural antioxidants such as anthocyanins, betalains, thymol, carvacrol, and resveratrol are known for their excellent antimicrobial properties. Anthocyanins are water-soluble pigments with glycoside features that are widely distributed in the plant kingdom. They are responsible for the reddish, orange, bluish, and purplish coloration of grapes, apples, roses, strawberries, and many plant products, mainly fruits and flowers [5]. Betalains are natural water-soluble pigments with nitrogen in their structure; they are synthesized from the amino acid tyrosine. Betalains are divided into two groups: betacyanins, which produce a red color, and betaxanthins, which provide a yellow color [6]. Thymol is a colorless, crystalline substance with a characteristic odor that is present in the essential oils of thyme or oregano. Thymol belongs to the group of terpenes and it has disinfectant and fungicidal features. Carvacrol is an isomer of thymol [7]. Resveratrol is an antioxidant produced by more than 70 species of plants in response to stressful situations (ultraviolet radiation, fungal infections, etc.). It is present in many foods, such as grapes [8].

Mesophilic aerobic bacteria grow in the presence of air and temperature ranges between 20 and 45 °C; their investigation in food science is very important, because they are indicators of food contamination due to contaminated raw materials, and inadequate cleaning and disinfection processes. Also, their presence indicates the existence of conditions that can favor the growth of pathogens such as *Clostridium botulinum*, *Cl. Perfringers*, *Bacillus mesentericus*, *B. subtilis*, *Lactobacillus lycopersici*, *L. pentaceticus*, etc. High counts of these bacteria indicate that food will soon spoil because of these microorganisms [9].

The presence of total coliforms is an indicator of potential fecal human contamination and the presence of enteric pathogens [10]. *Penicillium notatum* is a fungus that grows quickly, between 3 and 7 days. It rarely causes fungal disease in compromised patients [11]. *Aspergillus fumigatus* can cause allergic aspergillosis, which causes granulomas in the lungs. Rarely does the organism cause diseases in humans [12]. *Aspergillus niger* has various industrial applications. It can rarely cause external otitis and allergic aspergillosis [13].

The innovative purpose of this study is to intensify the biocidal properties of chitosan–starch films against food-contaminant-indicator microorganisms (mentioned here) by using organic and nontoxic materials, such as natural extracts, with demonstrated antimicrobial properties that are compatible with the matrix film. By using simple and cheaply obtained extracts from renewable resources, this innovation may also reduce costs. These new biomaterials are promising candidates for food packaging because of their lower transparency, higher opacity, flexibility, and adequate operating temperature.

2. Results and Discussion

2.1. Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of each film was observed using two series of three tests. A film was considered biocidal if it prevented the growth of microorganisms not only in its surface but also in its periphery. The antimicrobial activity of these films cannot be explained perfectly, but some

researchers have proposed several mechanisms. The antimicrobial activity of chitosan–starch with natural antioxidants from natural extracts may be attributable to the following mechanisms.

The electrostatic interaction between positively charged chitosan and some bacteria with negatively charged cellular membranes (such as certain types of aerobic mesophilic and coliform bacteria) significantly alters the barrier properties of these membranes. This implies the modification of nutrients and waste flow, resulting in the bacterium's elimination. The phospholipids present in the cellular membranes of Gram-negative bacteria interact with the NH- groups of the chitosan, causing the bacteria to lose cellular material. The chelating capacity of the chitosan can affect microbial growth. The use of acetic acid as a chitosan solvent can improve the antimicrobial activity of chitosan according to a study that showed that organic acids with low carbon numbers produce better antibacterial solutions [14].

The external membranes of bacteria protect them against polar organic compounds, which are harmful to them [15]. Consequently, it is possible that cell membranes are broken by the action of chitosan, promoting the entry of natural antioxidants into the cells. The antioxidants have antimicrobial properties and can therefore increase the antibacterial properties of chitosan. The interaction between positively charged amino groups of chitosan (positive charge is caused by the acid solvent) and negative residues in the fungi walls changes the permeability of the fungal plasmatic membrane, altering its main functions. The presence of chitosan inhibits some enzymatic synthesis on fungi and can favor the occurrence of cytological alterations [16].

Carvacrol is capable of breaking the external membrane of Gram-negative bacteria, causing the exit of lipopolysaccharides and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane [17]. The presence of carvacrol stimulates the removal of adenosine triphosphate (ATP) from the cell, inhibiting enzymes and decreasing the proton motive force [7,18].

Thymol is capable of disintegrating the external membrane of Gram-negative bacteria, resulting in the elimination of lipopolysaccharides and increased cytoplasmic membrane permeability. Thymol changes the membrane permeability and permits the loss of essential compounds such as ions, ATP, nucleic acids, and amino acids [7]. In our tests, most of the films with extracts demonstrated effectiveness against the presence of microorganisms, which is considered the main cause of food decomposition.

2.1.1. Previous Contamination Test

After incubation of the microorganisms for a proper period, the number of colony-forming units (CFU) developed in each case was counted. The limits specified in the relevant standards were considered, and we found that very few films presented numerous colonies. The results and film nomenclature are presented in Table 1. The CFU numbers presented in Table 1 were counted visually. Films were considered contaminated if they presented a CFU number equal to, or higher than, the number considered in the section 10 of each applicable norm. For mesophilic bacteria, plates with >25 CFU were considered contaminated [19]. For coliform bacteria, plates containing ≥ 1 CFU were considered contaminated [20]. For fungi, plates with >10 CFU were considered contaminated [21]. In the case of mesophilic aerobic bacteria, we found that most of the films (with the exception of QSG2, QSG5, and QSO5 in one of two tests) inhibited or reduced the growth of mesophilic aerobic bacteria. In the case of coliforms, it was observed that most of the films (with the exception of QSA0.5, QSB0.5, and QSP0.5 in one test) are sterile to coliforms, revealing that even if they are in contact with this kind of bacteria, they do not become contaminated. In the case of fungi, it was observed that most of the films presented better inhibition of environmental fungi than the control chitosan–starch film (QS2) (with the exception of QSA5, QSB0.5, QSO5, and QSP5). In summary, the presence of natural extracts provided the films with a better resistance to environmental microorganisms and human contact, which implies that most of them, unlike traditional biocide polymers, will not require a previous sterilization process.

Table 1. Results of previous contamination tests.

| Code Sample | Aerobic Mesophilic Bacteria (CFU) | | | Coliforms (CFU) | | | Fungi (CFU) | | |
|-------------|-----------------------------------|--------|---------------|-----------------|--------|---------------|-------------|--------|---------------|
| | Test 1 | Test 2 | Average Value | Test 1 | Test 2 | Average Value | Test 1 | Test 2 | Average Value |
| QS2 | 1 | 4 | 2.5 ± 2.12 | <1 | 2 | 1 ± 1.41 | 10 | 3 | 6.5 ± 4.95 |
| QSA0.5 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 |
| QSA2 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 1 | 1 | 1 ± 0 |
| QSA5 | 1 | 1 | 1 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 9 | 14 | 11.5 ± 3.54 |
| QSAm0.5 | <1 | 1 | 0.5 ± 0.71 | 1 | <1 | 0.5 ± 0.71 | 1 | 2 | 1.5 ± 0.71 |
| QSAm2 | <1 | <1 | 0 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | 1 | 0.5 ± 0.71 |
| QSAm5 | <1 | <1 | 0 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | 1 | 0.5 ± 0.71 |
| QSB0.5 | 1 | 1 | 1 ± 0 | 1 | <1 | 0.5 ± 0.71 | <1 | 17 | 8.5 ± 12.02 |
| QSB2 | 2 | <1 | 1 ± 1.41 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | 0 | <1 ± 0 |
| QSB5 | 3 | 1 | 2 ± 1.41 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 1 | 5 | 3 ± 2.83 |
| QSG0.5 | 2 | 3 | 2.5 ± 0.71 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 8 | 3 | 5.5 ± 3.54 |
| QSG2 | <1 | 26 | 13 ± 18.38 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 2 | 2 | 2 ± 0 |
| QSG5 | <1 | 31 | 15.5 ± 21.92 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 6 | 7 | 6.5 ± 0.71 |
| QSO0.5 | <1 | 1 | 0.5 ± 0.71 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 3 | 2 | 2.5 ± 0.71 |
| QSO2 | 10 | <1 | 5 ± 7.07 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 3 | 5 | 4 ± 1.41 |
| QSO5 | 3 | 27 | 15 ± 16.97 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 4 | 11 | 7.5 ± 4.95 |
| QSP0.5 | <1 | 2 | 1 ± 1.41 | <1 | 2 | 1 ± 1.41 | 2 | <1 | 1 ± 1.41 |
| QSP2 | <1 | 1 | 0.5 ± 0.71 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 3 | 1 | 2 ± 1.41 |
| QSP5 | 1 | 3 | 2 ± 1.41 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 10 | 1 | 5.5 ± 6.36 |
| QSR0.5 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | 1 | 0.5 ± 0.71 |
| QSR2 | <1 | <1 | <1 ± 0 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 1 | 1 | <1 ± 0 |
| QSR5 | <1 | 1 | 0.5 ± 0.71 | <1 | <1 | <1 ± 0 | 2 | 1 | 1.5 ± 0.71 |

Q: chitosan; S: starch; A: cranberry; Am: blueberry; B: beetroot; G: pomegranate; O: oregano; P: pitaya/dragon fruit; R: resveratrol; and CFU: colony-forming units; numbers refer to the weight percentage of extract used in each film.

2.1.2. Activity against Aerobic Mesophilic Bacteria

Most foodborne pathogenic bacteria are mesophilic (they grow in a range of temperature similar to that of the human body). For this reason, it is important to prove the inhibition capacity of our films against aerobic mesophilic bacteria (they are indicators of food contamination, but they are not pathogens in a strict sense). The control chitosan–starch film did not show any inhibitory effect on aerobic mesophilic bacteria. However, it was observed that all films with cranberry, blueberry and beetroot extracts, QSG2, QSG5, QSO2, QSO5, QSP0.5, and QSR5, showed an inhibition effect on these microorganisms in most cases. These results mean that the addition of antioxidants significantly improved the antibacterial activity of the films, especially in the case of anthocyanins, since they are more stable than any other kind of antioxidants. The antibacterial activities of chitosan–starch films with natural antioxidants after 48 h is shown in Table 2 (in accordance with section number 11—Test report of norm NOM-092-SSA1-1994 [19]—we had to report the bacterial growth at that time). We observed a significant improvement in antibacterial activity due to the addition of natural extracts, and the same behavior was observed in the research of Duran et al., which achieved improved inhibition of aerobic mesophilic bacteria by using natamycin, nisin, grape seed extract, and pomegranate extract [22]. A similar result was obtained by Yuan et al., who reduced the presence of aerobic bacteria in stored shrimp by the addition of pomegranate peel extract to a chitosan solution [23]. Paparella et al. improved antilisterial activity by using a mixture of chitosan and oregano essential oil [24]. Section 2.1 describes the antibacterial mechanisms.

2.1.3. Activity against Coliforms

Coliforms are Gram-negative bacteria that are indicators of possible food and water contamination; the main bacterium of this group is *Escherichia coli*. The control chitosan–starch film showed little inhibitory effect on coliform bacteria (only in one test). However, it was observed that all films with cranberry and blueberry, QSG5, QSR0.5, and QSR5, showed the inhibition of these microorganisms in most cases. The other films showed medium antibacterial activity. The beetroot films showed the same results as QS2. These results reveal that the addition of anthocyanins and resveratrol significantly

improved the inhibition effect on this group of bacteria. Anthocyanins were more effective than betalains and thymol/carvacrol, because they are more stable to changes. The antibacterial activity of chitosan–starch films with natural antioxidants after 24 h is shown in Table 2 (in accordance with section 11—Test report of norm NOM-113-SSA1-1994 [20]—we had to report the bacteria growth at that time). In accordance with the research of Shen et al. and Pranoto et al., we observed that chitosan in combination with natural extracts can inhibit the growth of *E. coli* (the representative bacteria of coliforms) [25,26]. See Section 2.1 for an explanation of the antibacterial mechanisms.

2.1.4. Activity against Fungi

Fungi are a huge group of microorganisms widely distributed in the environment. In this study, we observed inhibition activity against three kinds of fungi: *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus*. The *Penicillium* fungi and the *Aspergillus* fungi exist on most surfaces; they grow during food decomposition (for example in bread and fruits). They are not potentially dangerous to humans (except in those with weak immune systems). The control chitosan–starch film showed little inhibitory effect on coliform bacteria (only in two tests). However, it was observed that all the beetroot films, QSA5, QSAm2, QSAm5, QSG5, QSO5, and QSP0.5, showed the inhibition of these microorganisms in most cases. The resveratrol films showed medium antibacterial activity. The other two pomegranate films showed low antifungal activity. These results demonstrate that the addition of anthocyanins from cranberry, blueberry, and pomegranate, betalains from beetroot, and thymol/carvacrol from oregano in major quantities, significantly improved the inhibition of these groups of fungi. The antifungal activity of chitosan–starch films with natural antioxidants after five days (120 h) is shown in Table 2 (in accordance with section number 11—Test report of norm NOM-111-SSA1-1994 [21]—we had to report the fungi growth at that time). The control chitosan–starch film showed an inhibitory effect on fungi. In the research of Martínez-Camacho et al., Plascencia-Jatomea et al., and Ture et al., it was observed that chitosan does not totally inhibit fungal growth, although having a medium molecular weight, chitosan is a good fungistatic agent [27–29]. See Section 2.1 to read about the fungistatic mechanisms.

Table 2. Results of antimicrobial tests.

| Code Sample | Aerobic Mesophilic Bacteria | | Coliforms | | Fungi | |
|-------------|-----------------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|
| | Approved Test | Inhibition Zone, mm | Approved Test | Inhibition Zone, mm | Approved Test | Inhibition Zone, mm |
| QS2 | 0/6 | 0 ± 0 | 1/6 | 2 ± 0.89 | 2/6 | 1.333 ± 0.52 |
| QSA0.5 | 5/6 | 2.333 ± 0.52 | 4/6 | 2.333 ± 0.52 | 3/6 | 1.333 ± 0.52 |
| QSA2 | 5/6 | 2.5 ± 0.55 | 4/6 | 2.5 ± 0.55 | 3/6 | 3.5 ± 1.22 |
| QSA5 | 4/6 | 2.5 ± 0.55 | 5/6 | 2.5 ± 0.55 | 5/6 | 8 ± 2.76 |
| QSAm0.5 | 2/6 | 3.667 ± 0.52 | 4/6 | 1.5 ± 0.55 | 1/6 | 6.167 ± 2.40 |
| QSAm2 | 4/6 | 9.333 ± 1.03 | 3/6 | 3.333 ± 0.52 | 4/6 | 6.5 ± 2.35 |
| QSAm5 | 4/6 | 9.5 ± 0.84 | 4/6 | 3.5 ± 0.55 | 4/6 | 7 ± 2.76 |
| QSB0.5 | 4/6 | 1.167 ± 0.41 | 1/6 | 2.667 ± 0.82 | 4/6 | 7 ± 2.76 |
| QSB2 | 4/6 | 1.333 ± 0.52 | 1/6 | 2.833 ± 0.98 | 5/6 | 7.333 ± 2.58 |
| QSB5 | 4/6 | 2.5 ± 0.55 | 1/6 | 3 ± 0.89 | 5/6 | 7.5 ± 2.59 |
| QSG0.5 | 2/6 | 2.333 ± 0.82 | 1/6 | 1.833 ± 0.75 | 2/6 | 7.333 ± 2.58 |
| QSG2 | 5/6 | 4 ± 0.89 | 3/6 | 2.167 ± 0.75 | 0/6 | 7.333 ± 2.58 |
| QSG5 | 6/6 | 4.167 ± 0.98 | 4/6 | 2.167 ± 0.75 | 1/6 | 7.667 ± 2.58 |
| QSO0.5 | 3/6 | 4 ± 0.89 | 2/6 | 1.5 ± 0.55 | 2/6 | 1.5 ± 0.55 |
| QSO2 | 5/6 | 4.167 ± 0.75 | 4/6 | 1.5 ± 0.55 | 3/6 | 1.667 ± 0.52 |
| QSO5 | 6/6 | 4.167 ± 0.98 | 4/6 | 2 ± 0.63 | 4/6 | 1.667 ± 0.52 |
| QSP0.5 | 5/6 | 4 ± 0.89 | 1/6 | 1.833 ± 0.41 | 4/6 | 1.833 ± 0.41 |
| QSP2 | 3/6 | 3.5 ± 0.84 | 1/6 | 1.333 ± 0.52 | 3/6 | 1.333 ± 0.52 |
| QSP5 | 1/6 | 3.333 ± 0.82 | 2/6 | 1.333 ± 0.52 | 0/6 | 1.333 ± 0.52 |
| QSR0.5 | 2/6 | 1.833 ± 0.98 | 5/6 | 6.5 ± 2.35 | 3/6 | 2.5 ± 0.84 |
| QSR2 | 3/6 | 1.833 ± 0.75 | 2/6 | 7.167 ± 2.79 | 3/6 | 6.833 ± 2.93 |
| QSR5 | 4/6 | 2 ± 0.89 | 4/6 | 8 ± 2.76 | 3/6 | 7.167 ± 2.78 |

“Approved test” means that the films could inhibit microorganism growth in its periphery during the test period. The inhibition zone indicated for each film is related to the positive results shown during antimicrobial activity.

2.2. Thickness Measurement

The films had a homogeneous appearance, and they were easily peeled off from a polystyrene tray (except for QSP5, which was sticky). The samples presented different colorations due to the presence of different extracts. We observed similar behavior to that noticed by Benavides et al., which indicated that the addition of oregano essential oil produced bactericidal alginate films that were significantly thicker (0.031–0.038 mm) [30]. We used higher extract concentrations to prove that aqueous extracts can increase the film thickness. According to Qin et al. [31], the thickness of chitosan/montmorillonite films increased with the addition of pomegranate rind extract, because of its high molecular weight polyphenolic compounds. The films were prepared using the same amount of chitosan solution; the differences between the films were the quantities of montmorillonite and pomegranate rind extract. Nevertheless, the authors indicated that the increment of the film thickness is directly related only to the increment of the pomegranate extract [31]. Our samples showed a similar behavior to that described by Espitia et al. in their investigation, where the presence of apple skin polyphenols and thyme essential oil compounds increased the thickness of the control film [32]. In our investigation, the films were prepared and stored in a room with controlled temperature, and the quantities of each compound of the films were carefully measured in order to reduce the influence of the preparation and storage conditions on the thickness increase. In our research, the thickness increase can be attributed to the presence of natural antioxidants and to the variation of the water content in the starch solution.

Table 3 indicates the average film thickness of each sample. We observed that the addition of extracts enhanced the average thickness of the film (except QSB0.5). In some cases, the higher the extract concentrations, the thicker the film (especially for cranberry, blueberry, and beetroot). The thickness increase could be caused by the presence of compounds in the extract such as polysaccharides, carboxylic acids, antioxidants, etc., creating a more complex matrix. Thickness was confirmed by optical properties improvement and storage modulus decreases (both facts are related to film thickness).

Table 3. Average film thickness.

| Sample | Average Thickness, mm | Sample | Average Thickness, mm |
|---------|-----------------------|--------|-----------------------|
| QS2 | 0.164 ± 0.013 | QSG2 | 0.226 ± 0.009 |
| QSA0.5 | 0.194 ± 0.011 | QSG5 | 0.254 ± 0.025 |
| QSA2 | 0.214 ± 0.019 | QSO0.5 | 0.190 ± 0.01 |
| QSA5 | 0.238 ± 0.013 | QSO2 | 0.202 ± 0.013 |
| QSAm0.5 | 0.212 ± 0.015 | QSO5 | 0.194 ± 0.005 |
| QSAm2 | 0.244 ± 0.017 | QSP0.5 | 0.266 ± 0.021 |
| QSAm5 | 0.248 ± 0.043 | QSP2 | 0.216 ± 0.011 |
| QSB0.5 | 0.154 ± 0.005 | QSP5 | 0.272 ± 0.033 |
| QSB2 | 0.162 ± 0.018 | QSR0.5 | 0.184 ± 0.011 |
| QSB5 | 0.226 ± 0.015 | QSR2 | 0.174 ± 0.005 |
| QSG0.5 | 0.236 ± 0.011 | QSR5 | 0.238 ± 0.011 |

Precision = 0.01 mm.

2.3. Optical Properties (Transparency and Opacity)

To determine the light transmission properties of each film, we considered the percentage of transmittance at 280 nm, which corresponds to the transmission of UV light (this kind of light causes lipid oxidation in food). It was found that the addition of extracts gave the chitosan–starch films better barrier properties against ultraviolet light (except for QSR5). At 400 nm, the films with extracts presented lower transmittance percentages, indicating better light barrier properties in comparison with QS2 (except for QSR2). These results are presented in Table 4.

Table 4 shows the average film transparency of each sample. All the films (except for QSB0.5) presented lower transparency than QS2 (the control film). In most cases, the higher the extract content, the lower the film transparency.

At higher transparency, the film must have lower opacity. In Table 4, the average film opacity of each sample is reported. It is observed that the addition of extracts increased the opacity in comparison with QS2 (the control film), which means that the extracts improved the light barrier properties of the films (except in the case of QSO2). These results indicate that these films are effective against the second cause of food decomposition: lipid degradation. We observed different behavior than that of the films studied by Kanatt et al. [33]; we used higher quantities of extract and we obtained thicker films. This means that the quantity of extract has a significant effect on film thickness and, consequently, on its optical properties. Additionally, the film color had a significant effect on the optical properties. We observed that the control film QS2 is more crystalline and less thick than the films with extracts. For more details about film crystallinity, see Section 2.5.1.

Table 4. Transmittance percentages (%T) at 280 nm and 400 nm, transparency, and opacity of each film.

| Sample | %T at 280 nm | % T at 400 nm | Transparency | Opacity |
|---------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| QS2 | 10.2442 ± 0.71 | 30.8092 ± 2.34 | 9.74382 ± 0.19 | 0.07681 ± 0.01 |
| QSA0.5 | 0.0866 ± 0.070 | 3.94262 ± 1.78 | 7.03310 ± 0.52 | 0.12132 ± 0.0017 |
| QSA2 | 0.9668 ± 0.39 | 11.7966 ± 1.54 | 6.61022 ± 0.19 | 0.11328 ± 0.0084 |
| QSA5 | 0.5295 ± 0.12 | 16.8562 ± 1.90 | 6.50092 ± 0.20 | 0.11983 ± 0.0074 |
| QSAm0.5 | 1.0697 ± 0.33 | 16.5411 ± 1.85 | 6.98136 ± 0.21 | 0.13173 ± 0.02 |
| QSAm2 | 0.2182 ± 0.18 | 8.8739 ± 1.33 | 5.59052 ± 0.09 | 0.20691 ± 0.01 |
| QSAm5 | 0.3032 ± 0.15 | 7.9730 ± 0.82 | 5.39832 ± 0.26 | 0.21030 ± 0.02 |
| QSB0.5 | 2.0982 ± 0.78 | 25.4562 ± 3.24 | 10.3050 ± 0.27 | 0.07983 ± 0.02 |
| QSB2 | 0.2811 ± 0.13 | 11.4734 ± 2.14 | 9.34763 ± 0.24 | 0.11238 ± 0.01 |
| QSB5 | 0.0566 ± 0.05 | 1.1172 ± 0.22 | 4.80696 ± 0.29 | 0.33784 ± 0.02 |
| QSG0.5 | 0.4638 ± 0.15 | 12.8224 ± 0.54 | 6.37701 ± 0.07 | 0.13510 ± 0.01 |
| QSG2 | 0.9107 ± 0.22 | 17.0909 ± 1.57 | 6.8277 ± 0.051 | 0.13645 ± 0.01 |
| QSG5 | 0.1769 ± 0.23 | 1.6192 ± 0.82 | 5.18060 ± 0.67 | 0.25293 ± 0.01 |
| QSO0.5 | 2.0135 ± 0.47 | 17.5357 ± 2.39 | 7.83758 ± 0.25 | 0.08531 ± 0.0039 |
| QSO2 | 0.4690 ± 0.18 | 19.3792 ± 1.36 | 8.50917 ± 0.13 | 0.07273 ± 0.0058 |
| QSO5 | 0.2167 ± 0.29 | 5.6792 ± 1.50 | 8.21114 ± 0.08 | 0.10168 ± 0.0064 |
| QSP0.5 | 0.2437 ± 0.40 | 3.2979 ± 0.40 | 5.9859 ± 0.18 | 0.17956 ± 0.02 |
| QSP2 | 0.0272 ± 0.029 | 0.1323 ± 0.10 | 6.7034 ± 0.52 | 0.20245 ± 0.02 |
| QSP5 | 0.1623 ± 0.10 | 0.1195 ± 0.12 | 4.0516 ± 0.38 | 0.55747 ± 0.07 |
| QSR0.5 | 8.7779 ± 2.05 | 27.2905 ± 3.38 | 8.4157 ± 0.25 | 0.09657 ± 0.0077 |
| QSR2 | 10.9962 ± 4.31 | 26.4296 ± 9.05 | 6.6499 ± 0.81 | 0.09698 ± 0.02 |
| QSR5 | 4.7594 ± 0.22 | 31.5367 ± 3.17 | 7.0720 ± 0.16 | 0.09806 ± 0.01 |

2.4. pH Measurement

In Table 5, the pH values obtained for each film compound are reported. These results correspond to the average values of two tests. The following information was considered: anthocyanins are stable in acid media [5], betalains have their maximum stability at pH 5–6 [6], and resveratrol is stable in acid media [34]. These results confirm that acetic acid is a good solvent for chitosan (which has a low pH value). It is observed that the extracts with lower pH values (cranberry, blueberry, pomegranate, and beetroot) corresponded to films with better antimicrobial activity.

Table 6 presents the pH values after the synthesis (day one). With lower pH, antimicrobial activity is better. The most effective films during the antimicrobial tests (see Table 2) were those that had a lower pH after the synthesis (except pitaya). This may be related to the fact that antioxidants are more stable in acid media.

Table 6 also shows the pH values obtained when the films were dry and ready to use (day 15). We observed an increase in pH values, which could be a consequence of the chitosan solvent (acetic acid) evaporation during the drying period. It is possible that the addition of extracts causes a higher pH in comparison to QS2 due to the presence of certain extract compounds such as water.

Table 5. pH values of each reagent necessary for the film synthesis.

| Compound | pH |
|----------------------------------|--------------|
| Acetic acid at 1% (<i>v/v</i>) | 2.60 ± 0.028 |
| Chitosan at 2% (<i>w/v</i>) | 4.46 ± 0 |
| Starch at 2% (<i>w/v</i>) | 5.82 ± 0.014 |
| Cranberry extract | 2.86 ± 0.028 |
| Blueberry extract | 3.29 ± 0.014 |
| Beetroot extract | 4.31 ± 0.014 |
| Pomegranate extract | 3.11 ± 0.014 |
| Oregano extract | 5.24 ± 0 |
| Pitaya extract | 5.14 ± 0.014 |
| Resveratrol extract | 4.93 ± 0.014 |

Table 6. pH values of chitosan–starch films at day 1 and day 15.

| Sample | Day 1 | Day 15 |
|---------|--------------|--------------|
| | pH Meter | pH Meter |
| QS2 | 4.57 ± 0.007 | 5.29 ± 0.021 |
| QSA0.5 | 4.73 ± 0.007 | 5.86 ± 0.014 |
| QSA2 | 4.70 ± 0.007 | 5.54 ± 0.007 |
| QSA5 | 4.68 ± 0.014 | 5.33 ± 0.028 |
| QSAm0.5 | 4.11 ± 0.007 | 4.58 ± 0.014 |
| QSAm2 | 4.07 ± 0.007 | 4.47 ± 0.028 |
| QSAm5 | 4.02 ± 0.007 | 4.34 ± 0.007 |
| QSB0.5 | 4.83 ± 0.007 | 5.88 ± 0.007 |
| QSB2 | 4.78 ± 0.007 | 5.60 ± 0.028 |
| QSB5 | 4.62 ± 0.014 | 5.59 ± 0.007 |
| QSG0.5 | 4.52 ± 0.021 | 6.14 ± 0.014 |
| QSG2 | 4.41 ± 0 | 6.02 ± 0.035 |
| QSG5 | 4.31 ± 0.014 | 5.97 ± 0.007 |
| QSO0.5 | 4.81 ± 0.007 | 5.89 ± 0.014 |
| QSO2 | 4.77 ± 0.014 | 5.58 ± 0.035 |
| QSO5 | 4.62 ± 0.014 | 5.52 ± 0.007 |
| QSP0.5 | 4.01 ± 0.007 | 5.26 ± 0.007 |
| QSP2 | 4.04 ± 0.014 | 5.46 ± 0.014 |
| QSP5 | 4.09 ± 0.014 | 4.83 ± 0.014 |
| QSR0.5 | 4.65 ± 0.007 | 5.92 ± 0.021 |
| QSR2 | 4.62 ± 0.007 | 5.88 ± 0.007 |
| QSR5 | 4.59 ± 0.007 | 5.77 ± 0.028 |

The pH test values confirmed the presence of antioxidants as follows. At pH values higher than 7, anthocyanins were degraded, depending on their substituent groups. At pH values between 4 and 6 (all the films are in this range) the four structural forms of antioxidants can coexist. For this reason, it is possible to observe certain colorations in the cranberry, blueberry, and pomegranate films. However, there is color degradation in the presence of natural/artificial light [35].

Betalains are relatively stable in the pH range between 3 and 7 (the beetroot and pitaya films have pH values in this range) [36]. The optimum pH range for betalain stability is 5–6 [37]. Again, it was confirmed that films with lower pH values had the best results during the antimicrobial tests (see Table 2). This can be related to the fact that the antioxidants are more stable in acid media, which provides a good interaction with the chitosan–starch blend and potentiates the antimicrobial activity. The acetic acid had no relevant role on antimicrobial activity, because it was not an experimental variable: all the films, including the control film QS2, contained the same quantity of diluted acetic acid, and we observed that QS2 had weaker antimicrobial activity than the films with extracts (see Table 2). The same behavior was observed in the research of Gupta et al., they concluded that the addition of poly (acrylamide)/ZnS improves the antimicrobial activity of chitosan, not the acetic acid

presence [38] and Moreira et al., they indicated that the addition of sodium caseinate enhances the antimicrobial activity of chitosan, not the acetic acid [39]. In both researches, chitosan solutions were prepared using acetic acid solution at 1% in all their samples. Also, the pH increment between day 1 and 15 can be attributed to the partial volatilization of solvents such as water and acetic acid.

Analysis of variance (ANOVA) provided statistical evidence about the effect of the antioxidant, its concentration, and the measurement day on the pH values. If the calculated p value of a certain factor is less than the significance level, the null hypothesis of no difference among means, or no interaction among factors, is rejected, as displayed in Table 7. Because the three independent variables proved to produce at least one significant difference in the mean pH, a post hoc test (Tukey's method using 95% confidence intervals) was employed to explore which levels of the three factors could be considered as the sources of those differences. For instance, the statistical analysis allowed us to discover that the mean pH does not significantly differ among samples that contain resveratrol, pomegranate, beetroot, oregano, and cranberry (means of 5.244, 5.228, 5.220, 5.194, and 5.141, respectively, calculated considering just the antioxidant (AOX) as the cause of variation, according to the Tukey's method); nevertheless, an important difference in the mean pH values was detected as a result of the pitaya and blueberry incorporation (means of 4.610 and 4.262, respectively). In addition, the test revealed that the mean pH does not change considerably between the concentrations of 0.5% and 2% of antioxidant (means of 5.081 and 4.996, respectively), nor between the concentrations of 2% and 5% (4.996 and 4.880, respectively); however, at the confidence level of the Tukey's test, a representative change in the mean pH took place between the concentrations of 0.5% and 5% (5.081 and 4.880, respectively). It was also concluded that the day when the pH of the film is measured has an important effect on the mean value (means of 5.496 for day 1 and 4.475 for day 15), which is attributed to the evaporation of solvents during the drying period after the synthesis procedure. The possible combined interaction of the experimental factors was correspondingly studied to demonstrate which effects were dependent on each other. The analysis showed that just two joint interactions (AOX-day and AOX-%·AOX-day) induced significant differences among the mean pH results. Also, the effect of concentration extract, type of antioxidant and measurement day on the pH values of films can be observed in Figure 1.

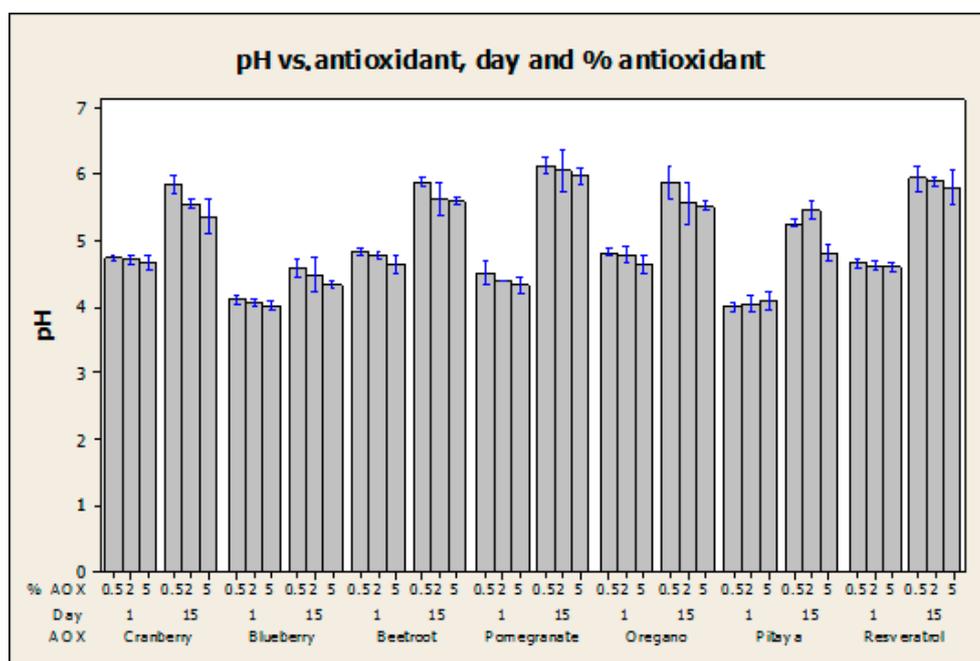


Figure 1. Effect of the concentration extract, type of antioxidant, and measurement day on the pH values of the films. Each data point represents the mean \pm standard deviation (SD); Analysis of variance (ANOVA), Tukey test, $p < 0.05$.

glycerol, and extracts, which possess antioxidants. These compounds are polyphenols, which contain OH- groups that form various bonds with the polymer matrix (e.g., hydrogen bonds) [33]. According to Bonilla et al., the decrease of storage modulus values in chitosan-based films can be attributed to the incorporation of natural compounds such as antioxidants and terpenes. This decrease is produced by discontinuities in the film structure and the lack of cohesion among polymeric chains. We deduced that our results are considered favorable due to the plasticizing effect of polyphenols from natural extracts, which, as explained by the studies mentioned before, allows a smoother displacement of the polymeric chains during the stretching of the films, and makes possible the undamaged deformations of each film [42].

We observed a decrease in the initial storage modulus values (see the E values at 35–40 °C in Figure 2), which is related to a less crystalline material. The decrease in crystallinity benefits the antimicrobial activity (see Table 2). The order of crystallinity is as follows: QS2 > QSA5 > QSG5 > QSAm5 > QSP0.5 > QSO5 > QSR5. A decrement in the film crystallinity reduces the intermolecular forces, giving less rigid and less brittle films.

Table 8. Storage modulus (E'), tan delta ($\tan \delta$), and glass transition temperature (T_g) of the films.

| Sample | Storage Modulus (E') | | T_g °C | Tan δ |
|--------|--------------------------|--------|---------------|--------------|
| | Average Value (MPa) | | | |
| | 50 °C | 100 °C | Average Value | |
| QS2 | 4753 | 3093 | 185.2 | 0.5405 |
| QSA0.5 | 3001 | 1967 | 158.4 | 0.330 |
| QSA2 | 3868 | 2633 | 90.1 | 0.166 |
| QSA5 | 2982 | 2065 | 87.1 | 0.151 |
| QSAm5 | 2214 | 497.17 | 104 | 0.361 |
| QSG5 | 2407 | 665 | 102 | 0.331 |
| QSO5 | 494 | 250 | 93.3 | 0.459 |
| QSP0.5 | 1668 | 838 | 102.1 | 0.321 |
| QSP5 | 925 | 376 | 95.3 | 0.364 |
| QSR5 | 441 | 179 | 88.6 | 0.542 |

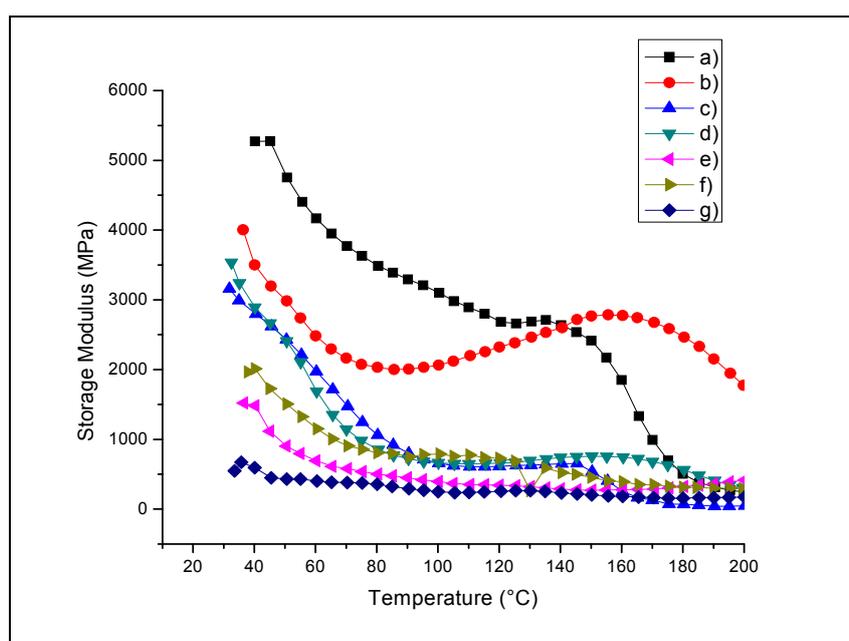


Figure 2. Storage modulus (E') of the chitosan–starch films: (a) QS2; (b) QSA5; (c) QSAm5; (d) QSG5; (e) QSO5; (f) QSP0.5; (g) QSR5.

2.5.2. Glass Transition Temperature (T_g)

The results of $\tan \delta$ ($\tan \delta$) and T_g are indicated in Table 8. The films analyzed by Dynamic Mechanical Analysis (DMA) showed good antimicrobial activity; see Table 2. Additionally, these films presented an improvement in their optical properties in comparison with QS2; see Table 4. In Figure 3, the $\tan \delta$ curves of QS2, QSA5, QSG5, QSO5, QSP0.5, and QSR5 are shown. A decrement of the $\tan \delta$ values is observed in films with natural extracts, indicating a clearly different behavior in the slippage between chitosan and starch chains depending on the natural extract added. The changes in structural behavior of these materials are clearly related to the extracts integrated into the material, and thus, modify the polymer movement depending on the nature of the integrated extract and its concentration. The T_g of the chitosan solution in acetic acid has been reported at 203 °C [27]. In the chitosan–starch films in this study, a T_g around 182 °C was found. A decrement of T_g was observed in every sample due to the different miscibility of each compound. A wider transition zone may indicate a possible reaction between the functional groups (antioxidants) and the film matrix. This reaction may be related to the decomposition of antioxidants, since they are unstable at high temperatures. Thus, as mentioned earlier, the $\tan \delta$ and T_g values decrease with the addition of extracts. The T_g measurement of a polymer blend can give information about the films' miscibility. A single peak in $\tan \delta$ curves could be an indication of good miscibility between chitosan–starch and the natural extracts [43]. These materials could be used for food packaging since T_g , or the operating temperature values, are above 80 °C.

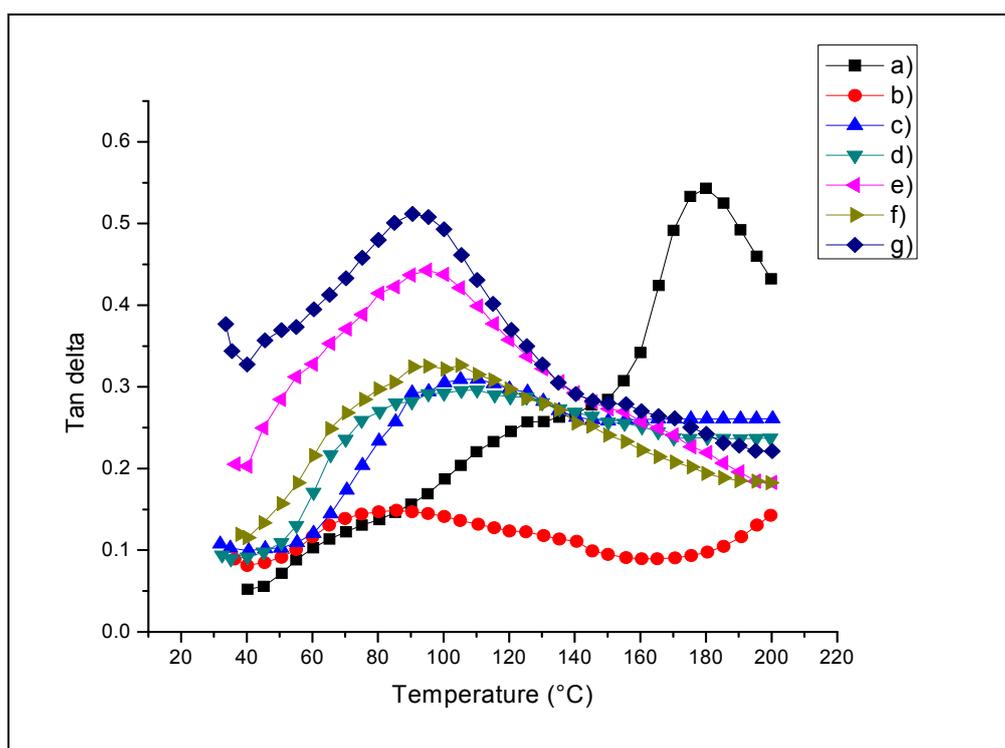


Figure 3. Tan delta ($\tan \delta$) of the chitosan–starch films: (a) QS2; (b) QSA5; (c) QSAm5; (d) QSG5; (e) QSO5; (f) QSP0.5; (g) QSR5.

3. Materials and Methods

3.1. Materials and Reagents

For the synthesis of chitosan–starch films, medium molecular weight chitosan with a degree of deacetylation of 85% (commercial compound obtained from shrimp) and rice starch were purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, Edo. Mex., Mexico). Glacial acetic acid and glycerol were bought from

Fermont (Monterrey, NL, Mexico). Extracts were obtained from raw fruits such as blueberry (130 g), beetroot (1 small beetroot weighing 220 g), and pitaya (1 regular pitaya weighing 277 g). These extracts were obtained from raw fruit pulp at 25 °C and were filtered prior to their addition in the chitosan–starch–glycerol blend. The aqueous extract of oregano was prepared at 5% (*w/v*) using dry oregano and water as a solvent; the solution was prepared at 65 °C for 10 min, with magnetic agitation and further filtration. Commercial organic cranberry and pomegranate juices were used; the extract was filtered at 25 °C before its addition to the blend. Resveratrol capsules were purchased from General Nutrition Centers (Pittsburgh, PA, USA). The resveratrol solution at 5% (*w/v*) was prepared using water as a solvent at 25 °C, after which the solution was filtered. It was very important to obtain the extracts of cranberry, blueberry, beetroot, pomegranate and pitaya at 25 °C in order to preserve their antioxidants [5–8]. Extracts were prepared in these forms with the purpose of reducing expenses, and avoiding toxic solvents. These aqueous extracts were compatible with the film matrix. For the microbiological methods, standard method agar, potato dextrose agar, and brilliant violet bile agar were purchased from Bioxon (Mexico City, Mexico). Tartaric acid was purchased from Mallinckrodt Chemical (St. Louis, MO, USA).

3.2. Synthesis of Films

The chitosan solution (2%, *w/v*) was prepared in glacial acetic acid solution (1%, *v/v*). The resulting solution was stirred for 24 h at room temperature. The rice starch solution (2% *w/v*) was prepared by heating at 90 ± 2 °C for 20 min with constant stirring. The solution was cooled to approximately 25 °C. For preparing each film, 40 mL of chitosan solution was mixed with 40 mL of rice starch solution. Afterwards, 0.2 mL of glycerol was added as a plasticizer. Each blend was stirred for 5–10 min, and then, poured in a polystyrene tray. The films were dried at 25 °C for 15 days [44]. For the films with natural antioxidants, three fixed quantities (0.4, 1.6, and 4 mL) of each extract were added (corresponding to the 0.5%, 2%, and 5% weights of the total blend). The only caution needed during the synthesis was related to the manipulation of glacial acetic acid, glycerol, and the hot starch solution (90 ± 2 °C). Twenty-two films were prepared: one control film (QS2) and twenty-one films with natural extracts (three films for each extract). The explanation of the code used for each film is given in Table 1.

3.3. Antimicrobial Activity

The agar plate method was used to evaluate the antimicrobial activities of the chitosan–starch films with natural extracts against the control chitosan–starch film. The antimicrobial activities of the films were tested against *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, coliforms, and aerobic mesophilic bacteria, and a previous contamination test was carried out before the addition of these microorganisms in order to ensure that they had no microorganisms prior to the antimicrobial test. For the antimicrobial tests (see Sections 3.3.2–3.3.4), it was necessary to use dilutions to reduce the microbial load for facilitating the microbial counting. It is necessary to be cautious during the preparation of these agars because they are very hygroscopic. Thus, latex gloves and surgical masks were used during all antimicrobial tests. During the antimicrobial tests, the inhibition zone of each film was measured using a Vernier with a millimeter scale, considering the zone of inhibition as the difference between the diameter of the inhibition zone and the diameter of the disk [45]. The measurement was made for each test, and the average values are indicated in Table 2.

3.3.1. Previous Contamination Test

This test was carried out to ensure that the films were capable of inhibiting environmental microorganisms prior to the antimicrobial activity tests. This means that the films are capable of inhibiting microorganisms introduced by human manipulation or surface contact. In 5 mL of sterilized distilled water, a 1 cm² film sample was placed for 24 h. Subsequently, 1 mL of this water was added

to a petri dish without dilution. Later, the correspondent agar was added. The procedures for growing microorganisms indicated in Sections 3.3.2–3.3.4 were used in this test.

3.3.2. Activity against Aerobic Mesophilic Bacteria

Standard method agar was used for the growth of aerobic mesophilic bacteria. To prepare 100 mL of agar solution, 2.35 g of agar was dissolved in distilled water. The solution was heated and boiled for one minute under constant stirring. The agar was sterilized in an autoclave at a pressure of 15 pounds for 15 min. Potable water was used as a sample. One ml of sample was added to each petri dish. Next, agar was poured into the petri dishes. Each petri dish was moved seven times to the right, seven times to the left, and seven times up and down to mix the agar and sample. Once the agar solidified, six disks from the same sample/film were placed on it, considering the distance among them. The petri dishes were incubated at 37 °C. The antibacterial activity was observed for two days at 37 °C [19].

3.3.3. Activity against Coliforms

Brilliant violet bile agar was used for growing total coliforms. To prepare 100 mL of agar solution, 4.15 g of agar was dissolved in distilled water. The solution was heated and boiled for one minute under constant stirring. Agar and dilution tubes (with 10 mL of distilled water) were sterilized in an autoclave at a pressure of 15 pounds for 15 min. Horchata (La Vitrolera, Tampico, TAMPS, Mexico) was used as the sample because this beverage presented a high number of total coliform CFU in previous analyses. One ml of sample was placed in the dilution tube with 10 mL of sterilized water. Subsequently, a second dilution was made using 1 mL of the first dilution in 10 mL of sterilized water. Later, 0.1 mL of the second dilution was added to each petri dish. Next, agar was poured into the petri dishes. Each petri dish was moved seven times to the right, seven times to the left, and seven times up and down to mix the agar and sample. Once the agar solidified, six disks from the same sample/film were placed over it, considering the distance among them. The petri dishes were incubated at 37 °C. The antibacterial activity was observed for one day at 37 °C [20].

3.3.4. Activity against Fungi

Potato dextrose agar was used for growing fungi. To prepare 100 mL of agar solution, 3.9 g of agar was dissolved in distilled water. The solution was heated and boiled for one minute under constant stirring. Tartaric acid solution at 10% (*w/v*) was prepared. Agar, tartaric acid, and dilution tubes (with 10 mL of distilled water) were sterilized in an autoclave at a pressure of 15 pounds for 15 min. A measurement of 1.4 mL of tartaric acid was added for each 100 mL of agar in order to obtain a pH of approximately 3.5. *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus* colonies were used as samples. The fungi colonies were scraped using a sterilized inoculating loop and the sample was placed in a dilution tube. Subsequently, a second dilution was made using 1 mL of the first dilution in 10 mL of sterilized water. One mL of the second dilution was added to each petri dish. Next, agar was poured into the petri dishes. Each petri dish was moved seven times to the right, seven times to the left, and seven times up and down to mix the agar and sample. Once the agar solidified, six disks from the same sample/film were placed on its surface considering the distance among them. The petri dishes were incubated at 25 °C. Antifungal activity was observed for five days at 25 °C in accordance with the norm [21].

The disk diffusion method (as required by the World Health Organization) was used during all antimicrobial tests to study the effectiveness of the films against various microorganisms. A circular sample of each polymer film was placed on agar [46].

3.4. Thickness Measurement

Film thickness was measured with a manual micrometer OBI 264105 (range of measurement 0–25 mm) (OBI Asia Trade, Hong Kong, China). Five measurements were taken for each film, one

at the center and four around the perimeter. The thickness is reported as the average of the five measurements [33].

3.5. Optical Properties Using Ultraviolet–Visible Spectroscopy

A rectangular sample (4.5 × 0.5 cm) of every film was cut and placed in a quartz cell, which was introduced into a Cintra 303 UV-Vis spectrophotometer (GBC Scientific Equipment, Mexico City, Mexico). Air was used as the reference. Each spectrum was obtained at wavelengths from 200–800 nm, and every film was tested three times. The results were reported as an average of the transmittance percentage (%T). The transparency was obtained by using the value of % transmittance at 600 nm (%T) and Equation (1) [33].

$$T = -\log \%T_{600}/b \quad (1)$$

where %T is the transmittance percentage and *b* is the average film thickness in mm.

The opacity (*O*) was obtained using the average absorbance at 500 nm. Each film was tested three times, and the opacity was calculated using Equation 2 [33].

$$O = A_{500} \times b \quad (2)$$

where *A*₅₀₀ is the absorbance at 500 nm and *b* is the average film thickness in mm.

3.6. pH Measurement

In order to observe the relationship between pH and the antimicrobial activity of the films, the pH was determined using a HI 2212 HANNA Instruments pH meter (HANNA Instruments, Woonsocket, RI, USA). To determine the film pH during the synthesis (day one), the electrode was submerged in the film blend. Two pH measurements were made. The results are reported as an average value. To determine the film pH when dry (day 15), the procedure described in the ASTM D 6739 Standard Test Method for Silica—pH Value (Annex A) was used, which coincides with the procedure stipulated in the Mexican norm NMX-F-317-S-1978 (*Determinación de pH en alimentos*). Distilled water was boiled for 10 min in a covered container. Next, 0.5 g of previously pulverized sample was taken and added to a container with 10 mL of that water and the container was covered. The blend was stirred for five minutes at room temperature. Two pH measurements were made at room temperature, and the results are reported as an average value [47].

3.7. Dynamic Mechanic Analysis (DMA)

To determine the thermomechanical properties and the influence of the extracts present in the structure of the films, a DMA 800 Perkin Elmer dynamic mechanic analyzer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) was used at a temperature range from 25–200 °C and a ramp of 10 °C per minute in an atmosphere of N₂. Two tests were performed and the results are presented as average values.

3.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Excel (2013 version, Microsoft, Redmond, WA, USA). Multi-factor analysis of variance (ANOVA) using Minitab (16 version, Pennsylvania State University, State College, PA, USA) was used to determine if the formulation, storage period, or the interaction of these effects had a significant impact on the film solution pH. The statistically significant differences between means were evaluated using the Tukey's test (*p* < 0.05).

4. Conclusions

Based on our results, we conclude that the addition of extracts, especially at concentrations of 2% and 5% *v/v*, increases antimicrobial activity. No previous sterilization is necessary for most of these materials. The addition of antioxidant-containing extracts provides a film with better UV–VIS

light barrier properties, which implies higher values of opacity and lower values of transparency. The presence of extracts improves the mechanical properties of the films. Additionally, we observed a thickness increment derived from the extract presence. These desirable characteristics were more frequent in the films with cranberry, blueberry, and beetroot extracts. Most of the films prepared in this study have a potential application in the food packaging industry because they are non-toxic, biodegradable, and cheap materials that can inhibit food contamination/degradation. These materials have lower transparency, higher opacity, and better mechanical properties than the control film QS2.

Future research directions include the study of extract effects on the morphological, thermal, and structural properties of the films and their relationship with antimicrobial activity, optical, and mechanical properties.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the Ph.D. candidate scholarship to Jessica I. Lozano-Navarro. We would like to thank Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) for the reagents and materials provided through the 5020.13-P project.

Author Contributions: Nancy P. Díaz-Zavala and Carlos Velasco-Santos conceived and designed the experiments; Jessica I. Lozano-Navarro performed the experiments; Beatriz I. Tijerina-Ramos, Margarita García-Hernández, and Ana L. Martínez-Hernández analyzed the data; José Luis Rivera-Armenta, Ulises Páramo-García, and Adriana I. Reyes-de la Torre contributed reagents/materials/analysis tools.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ai, H.; Wang, F.; Xia, Y.; Chen, X.; Lei, C. Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L. *Food Chem.* **2012**, *132*, 493–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ishihara, M.; Nguyen, V.Q.; Mori, Y.; Nakamura, S.; Hattori, H. Adsorption of Silver Nanoparticles onto Different Surface Structures of Chitin/Chitosan and Correlations with Antimicrobial Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 13973–13988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Xua, Y.X.; Kim, K.M.; Hanna, M.A.; Nag, D. Chitosan–starch composite film: Preparation and characterization. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *21*, 185–192. [[CrossRef](#)]
4. Dai, J.; Mumper, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15*, 7313–7352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ocampo, R.; Ríos, L.A.; Betancur, L.A.; Ocampo, D.M. *Curso Práctico de Química Orgánica Enfocado a Biología y Alimentos*, 1st ed.; Editorial Universidad de Caldas: Manizales, Colombia, 2008.
6. Marañón-Ruiz, V.F.; Rizo de la Torre, L.D.C. Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía UV–VIS y barrido en Z. *Superficies y Vacío* **2011**, *24*, 113–120.
7. García-García, R.M.; Palou-García, E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* **2008**, *2*, 41–51.
8. Gambini, J.; López-Grueso, R.; Olaso-González, G.; Inglés, M.; Abdelazida, K.; El-Alami, M.; Bonet-Costa, V. Borrás, C.; Viña, J. Resveratrol: Distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología* **2013**, *48*, 79–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Thatcher, F.S.; Clark, D.S. *Análisis Microbiológico de los Alimentos*, 1st ed.; Acribia: Zaragoza, Spain, 1973; pp. 31–33.
10. Fatemeh, D.; Reza, Z.M.; Mohammad, A.; Salomeh, K.; Gholam Reza, A.; Hossein, S.; Maryam, S.; Azam, A.; Mana, S.; Negin, N.; et al. Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture (Most Probably Number). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, 404–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Carpenter, P.; Blengio Pinto, J.R. *Microbiología*, 2nd ed.; Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V.: Mexico City, Mexico, 1979; pp. 144–145, 150–157, 218, 334–335, 376.
12. Walker, S. *Microbiología*, 4th ed.; McGraw-Hill: Mexico City, Mexico, 2000.
13. Chakraborty, D.; Chakraborti, S. Bioassay-guided isolation and identification of antibacterial and antifungal component from methanolic extract of green tea leaves (*Camellia Sinensis*). *Res. J. Phytochem.* **2010**, *4*, 78–86. [[CrossRef](#)]

14. Lárez Velásquez, C. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* **2008**, *8*, 1–22.
15. Lengeler, J.; Drews, G.; Schlege, H. *Biology of the Prokaryotes*, 2nd ed.; Thieme Publishing Group: Stuttgart, Germany, 1999.
16. Barka, E.A.; Eullaffroy, P.; Clément, C.; Vernet, G. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep.* **2004**, *22*, 608–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 453–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Burt, S.A.; Van der Zee, R.; Koets, A.P.; De Graaff, A.M.; Van Knapen, F.; Gaastra, W.; Haagsman, H.; Veldhuizen, J.A. Carvacrol induces heat shock protein and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* 0157: H7. *Appl. Environ. Microb.* **2007**, *73*, 4484–4490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. *Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en placa*, *Diario Oficial de la Nación*; Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos: Mexico City, Mexico, 1995.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. *Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa*, *Diario Oficial de la Nación*; Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos: Mexico City, Mexico, 1995.
21. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y Servicios. *Método para la Cuenta de Mohos y Levaduras en Alimentos*, *Diario Oficial de la Nación*; Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos: Mexico City, Mexico, 1995.
22. Duran, M.; Aday, M.S.; Zorba, N.N.D.; Temizkan, R.; Büyükcın, M.B.; Caner, C. Potential of Antimicrobial Active Packaging ‘Containing Natamycin, Nisin, Pomegranate and grape seed extract in chitosan coating’ to extend shelf life of fresh strawberry. *Food Bioprod. Process.* **2016**, *98*, 354–363. [[CrossRef](#)]
23. Yuan, G.; Lv, H.; Tang, W.; Zhang, X.; Sun, H. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Control* **2016**, *59*, 818–823. [[CrossRef](#)]
24. Paparella, A.; Mazzarrino, G.; Chaves-Lopez, C.; Rossi, C.; Sacchetti, G.; Guerrieri, O.; Serio, A. Chitosan boosts the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil in modified atmosphere packaged pork. *Food Microbiol.* **2016**, *59*, 23–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shen, X.L.; Min Wu, J.; Chen, Y.; Zhao, G. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocoll.* **2010**, *24*, 285–290. [[CrossRef](#)]
26. Pranoto, Y.; Rakshit, S.K.; Salokhe, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Food Sci. Technol.* **2005**, *38*, 859–865. [[CrossRef](#)]
27. Martínez-Camacho, A.P.; Cortez-Rocha, M.O.; Ezquerro-Brauer, J.M.; Graciano-Verdugo, A.Z.; Rodríguez-Félix, F.; Castillo-Ortega, M.M.; Yépiz-Gómez, M.S.; Plascencia-Jatomea, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 305–315. [[CrossRef](#)]
28. Plascencia-Jatomea, M.; Viniegra, G.; Olayo, R.; Castillo-Ortega, M.; Shirai, K. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 582–586. [[CrossRef](#)]
29. Ture, H.; Eroglu, E.; Ozen, B.; Soyer, F. Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 154–160. [[CrossRef](#)]
30. Benavides, S.; Villalobos-Carvajal, R.; Reyes, J.E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *J. Food Eng.* **2012**, *110*, 232–239. [[CrossRef](#)]
31. Qin, Y.-Y.; Zhang, Z.-H.; Li, L.; Yuan, M.-L.; Fan, J.; Zhao, T.-R. Physio-mechanical properties of an active chitosan film incorporated with montmorillonite and natural antioxidants extracted from pomegranate rind. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 1471–1479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Espitia, P.J.P.; Avena-Bustillos, R.J.; Du, W.-X.; Chiou, B.-S.; Williams, T.G.; Wood, D.; McHugh, T.H.; Soares, N.F.F. Physical and Antibacterial Properties of Acai Edible Films Formulated with Thyme Essential Oil and Apple Skin Polyphenols. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, M903–M910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kanatt, S.R.; Rao, M.S.; Chawla, S.P.; Sharma, A. Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocoll.* **2012**, *29*, 290–297. [[CrossRef](#)]

34. Zupančič, S.; Lavrič, Z.; Kristl, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 196–204. [CrossRef] [PubMed]
35. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859–871. [CrossRef]
36. Jackman, R.L.; Smith, J.L. *Anthocyanins and Betalains*, in *Natural Food Colorants*, 2nd ed.; Blackie Academic & Professional: Londres, UK, 1996; pp. 244–309.
37. Azeredo, H.M.C. Betalains: Properties, sources, applications, and stability—A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 2365–2376. [CrossRef]
38. Gupta, D.; Singh, D.; Kothiyal, N.C.; Saini, A.K.; Singh, V.P.; Pathania, D. Synthesis of chitosan-g-poly(acrylamide)/ZnS nanocomposite for controlled drug delivery and antimicrobial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *74*, 547–557. [CrossRef] [PubMed]
39. Del, R.; Moreira, M.; Pereda, M.; Marcovich, N.E.; Roura, S.I. Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, M54–M63.
40. Al-Sagheer, F.; Merchant, S.S. Visco-elastic properties of chitosan-titania nano-composites. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85*, 356–362. [CrossRef]
41. Domínguez-Courtney, M.F.; Jiménez-Munguía, M.T. Películas formuladas con polisacaridos: Propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* **2012**, *6*, 110–121.
42. Bonilla, J.; Atarés, L.; Vargas, M.; Chiralt, A. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocoll.* **2012**, *26*, 9–16. [CrossRef]
43. Lazaridou, A.; Biliaderis, C.G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *48*, 179–190. [CrossRef]
44. Torres-Delgado, C.L.; Diaz-Zavala, N.P.; Velasco-Santos, C.; Salas, P.; Martinez-Hernandez, A.L. *Synthesis and Characterization of Chitosan–Starch Films Reinforced with TiO₂ Nanoparticles*; Memorias del XIX International Material Research Congress; Material Research Society & Sociedad Mexicana de Materiales A.C.: Cancun, Mexico, 2010.
45. Parente, E.; Brienza, C.; Moles, M.; Ricciardi, A. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Methods* **1995**, *22*, 95–108. [CrossRef]
46. Comité de Expertos en Antibióticos. *Unificación de Métodos para las Pruebas de Sensibilidad Microbiana*; Segundo Informe del Comité de Expertos en Antibióticos Serie de Informes Técnicos No 210; World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, 1961.
47. ASTM D 6739 Standard Test Method for Silica—pH Value, 2015. Available online: <https://www.astm.org/Standards/D6739.htm> (accessed on 22 August 2016).



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).