



**INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE CIUDAD MADERO**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOCIDA EN PELÍCULAS DE QUITOSANO-ALMIDÓN CON ANTIOXIDANTES NATURALES

Para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta:
Ing. Jessica Ismalé Lozano Navarro

Directora de Tesis:
Dra. Nancy Patricia Díaz Zavala

Co-Director de Tesis:
Dr. Carlos Velasco Santos

Cd. Madero, Tamaulipas

Marzo de 2012



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
 DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
 INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD MADERO

SECRETARÍA DE
 EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

Ciudad Madero, Tamps; a **12 de Marzo de 2012**

OFICIO No.: U1.222/12
 AREA: DIVISIÓN DE ESTUDIOS
 DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
 ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. ING. JESSICA ISMALÉ LOZANO NAVARRO
 PRESENTE

Me es grato comunicarle que después de la revisión realizada por el Jurado designado para su examen de grado de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química, se acordó autorizar la impresión de su tesis titulada:

**"EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOCIDA EN 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"

M. P. María Yolanda Chávez Cinco
M. P. MARÍA YOLANDA CHÁVEZ CINCO
 JEFA DE LA DIVISIÓN



S.E.P.
 DIVISION DE ESTUDIOS
 DE POSGRADO E
 INVESTIGACION
 I T C M

c.c.p.- Minuta
 Archivo

MYCHC R/AC ayrc



Dedicatoria

A Ti, Dios, por todas las bendiciones recibidas, por darme lo necesario en cada momento de mi vida. Contigo todo es posible.

A la Virgen de Guadalupe por su protección y todas las bendiciones recibidas.

A mis Padres, Hermanas y Abuelos por su amor incondicional, su apoyo, por animarme a lograr mis metas, por cada cosa que han hecho por mí, por la confianza, y por estar conmigo incondicionalmente.

A mis amigos por su afecto, sus consejos, por estar conmigo siempre, por compartir metas y sueños.

A todas las personas involucradas en la redacción de esta tesis.

Agradecimientos

A Dios y a la Virgen de Guadalupe, por lograr mis estudios de maestría, por las personas que he conocido y los momentos vividos durante esta etapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca No. 345382/ 237582 y otros apoyos para la realización de estudios de maestría.

A la Dra. Nancy Patricia Díaz Zavala (DEPI – ITCM), por su asesoría, apoyo, paciencia, conocimientos, confianza y las horas de trabajo otorgadas durante la realización de este proyecto de investigación. Ha sido una grata experiencia trabajar bajo su asesoría.

Al Dr. Carlos Velasco Santos (CFATA – UNAM), por su co-asesoría, apoyo y confianza y horas invertidas en la realización de este proyecto.

A la Dra. Marisela Estefanía Ángeles San Martín, por su apoyo, horas invertidas y consejos para la redacción de tesis. Gracias por la realización de las pruebas de FTIR para el desarrollo de este proyecto. Por su asesoría y conocimiento.

Al Dr. Sergio Robles Andrade, por su apoyo, horas invertidas y consejos para la redacción de tesis. Por su asesoría y conocimiento.

Al Dr. Ricardo García Alamilla, por su apoyo y consejos como Tutor durante la maestría. Por su asesoría y conocimiento.

A la I.Q. Beatriz Imelda Tijerina Ramos, por el apoyo, consejos y horas dedicadas para las realización de las pruebas antimicrobianas. Por su asesoría y conocimiento.

Al Dr. Ulises Páramo García, por la realización de las pruebas de SEM para el desarrollo de este proyecto. Por su asesoría y conocimiento.

Al Dr. José Luis Rivera Armenta por la realización de las pruebas de DMA para el desarrollo de este proyecto. Por su asesoría y conocimiento.

Al Dr. José Guillermo Sandoval Robles, por la realización de las pruebas de TGA para el desarrollo de este proyecto.

A la M.P. María Yolanda Chávez Cinco, a la Dra. Rocío del Carmen Antonio Cruz y al Dr. Hugo de Alva Salazar por el apoyo otorgado durante la realización de mis estudios y permitirme alcanzar esta meta.

A los maestros de la DEPI – ITCM, Dra. Ana Morales Cepeda, M. Gladis Galiana Bravo, Dra. Claudia Ramos Galván, Dra. Rebeca Silva Rodrigo, Dra. Adriana Reyes de la Torre, Dra. Nohra Gallardo, Dr. Aarón Melo Banda, Dr. Juan Robledo Muñoz, Dr. Alfredo Castillo Mares y Dr. Tomás Lozano, por su apoyo, consejos y conocimientos a lo largo de mis estudios de maestría.

Al I.Q. Álvaro García por el apoyo técnico en el desarrollo del proyecto de investigación.

Al personal administrativo de la DEPI-ITCM, Aracely González Caballero, Jimena Acuña Ramírez, María del Socorro Szymanski Ramírez y Andrés Rocha Maldonado por el apoyo y facilidades otorgadas.

A mis amigos y compañeros de generación, Angélica Mayes, Cynthia Razo, Eloísa Gómez, Ignacio Martínez, Karina Cruz, Leonardo Blanco, Pablo Camacho; por su amistad, apoyo y consejos. Aprendí mucho de cada uno de ustedes. Maravillosos compañeros.

A mis amigos y compañeros de maestría, especialmente a Gloria, David, Anjuli, Yahaira, Daniel, Mónica, Rafael, José Miguel, Flavio, Eugenio, Patricia, Elías, Josué y Antonio por su amistad y apoyo. Excelentes compañeros. Muchas gracias por los momentos compartidos y por los excelentes amigos que son.

Resumen

Cada año la presencia de microorganismos genera enfermedades y pérdidas económicas. Para resolver este problema se han desarrollado diferentes investigaciones para generar nuevos materiales biocidas. Entre los polímeros naturales que presentan este tipo de actividad antimicrobiana se encuentra el quitosano.

El quitosano es un polisacárido natural y biodegradable obtenido a partir de la quitina. Esta sustancia tiene muchas aplicaciones comerciales y biomédicas. Por otro lado, existen compuestos químicos que se pueden encontrar en productos naturales tales como las catequinas y las antocianinas. Las catequinas son antioxidantes presentes en el té verde y sus variantes, las cuales son pigmentos naturales de color café o verde. Las antocianinas son antioxidantes presentes en diversas frutas y hortalizas, como granada, betabel y arándano; las cuales son pigmentos de color morado, rojo o azul.

En el presente trabajo de investigación se elaboraron películas poliméricas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales, en diferentes concentraciones, obtenidos de diferentes productos naturales tales como el té verde, té negro, la granada, el arándano y el betabel. Las propiedades antimicrobianas de las películas conteniendo los antioxidantes y sin ellos, se determinaron por el crecimiento o la inhibición de hongos, levaduras y bacterias.

Las películas fueron caracterizadas mediante las técnicas de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, Microscopía Electrónica de Barrido, Análisis Dinámico Mecánico y Análisis Termogravimétrico, para analizar sus cambios en estructura química, morfología y propiedades termomecánicas.

Las películas de quitosano-almidón sintetizadas usando granada y betabel presentaron mejores propiedades biocidas, térmicas y mecánicas en comparación con las películas quitosano-almidón.

Abstract

Year after year the presence of microorganisms generates diseases and economic losses. In order to resolve this problem have been developed different investigations to generate new biocide materials. Among the natural polymers that exhibit this type of antimicrobial activity is chitosan.

Chitosan is a natural and biodegradable polysaccharide derived from chitin. This substance has many commercial and biomedical applications. On the other hand, there are chemical compounds such as catechins and anthocyanins that can be found in natural products. Catechins are antioxidants present in green tea and its variants, which are natural pigments, brown or green. Anthocyanins are pigments in purple, red or blue. They are antioxidants present in various fruits and vegetables, for example pomegranate, beets and cranberry.

In the present investigation, polymeric films of chitosan-starch with natural antioxidants were prepared in different concentrations, obtained from different natural products such as green tea, black tea, pomegranate, cranberry and beet. The antimicrobial properties of the films containing antioxidants and without them were determined by the growth or inhibition of fungi, yeasts and bacteria.

The films were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy, Dynamic Mechanical Analysis and Thermogravimetric Analysis to analyze the changes in chemical structure, morphology and thermomechanical properties.

The chitosan-starch films synthesized using pomegranate and beet showed better biocidal, thermal and mechanical properties compared to chitosan-starch films.

Índice

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	xi
Acrónimos	xii
Introducción	1
1.- Fundamento teórico	3
1.1.- Películas biocidas	3
1.2.- Generalidades de los materiales	4
1.2.1.- Quitosano	4
1.2.2.- Almidón	7
1.2.3.- Té verde	11
1.2.4.- Té negro	12
1.2.5.- Granada	13
1.2.6.- Betabel	15
1.2.7.- Arándano	16
1.3.- Antioxidantes naturales	17
1.3.1.- Catequinas	19
1.3.2.- Antocianinas	20
1.4.- Microorganismos	23
1.4.1.- Bacterias	23
1.4.1.1.- Mesofílicos aerobios	26
1.4.2.- Hongos	26
1.4.2.1.- <i>Penicillium notatum</i>	29
1.4.2.2.- <i>Aspergillus Níger</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>	30
1.4.3.- Levaduras	32
1.4.3.1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35

1.5.- Antecedentes	36
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	42
2.4.- Prueba antimicrobiana	43
2.4.1.- Cultivo de hongos y levaduras	43
2.4.2.- Cultivo de mesófilos aerobios	44
2.5.- Métodos de caracterización	45
2.5.1.- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	45
2.5.2.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)	46
2.5.3.- Análisis Dinámico Mecánico (DMA)	47
2.5.4.- Análisis Termogravimétrico (TGA)	49
3.- Resultados y discusión	51
3.1.- Identificación y clasificación de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales.	51
3.2.- Características de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales.	52
3.3.- Prueba antimicrobiana	53
3.3.1.- Identificación de microorganismos	53
3.3.2.- Observación de la actividad antimicrobiana.	55
3.4.- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	62
3.5.- Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	68
3.6.- Análisis Dinámico Mecánico (DMA)	73
3.7.- Análisis Termogravimétrico (TGA)	85
4.- Conclusiones	92
Bibliografía	95

Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
1.1	Estructuras de la quitina y el quitosano	5
1.2	Esquema de la obtención de quitina y quitosano a partir de crustáceos	6
1.3	Estructura del almidón	7
1.4	Gelatinización del almidón	9
1.5	Estructura de las catequinas	20
1.6	Estructura y sustituyentes de las antocianinas	21
1.7	Formas comunes de las bacterias	24
1.8	<i>Penicillium notatum</i>	30
1.9	Cuerpos reproductivos de <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> y <i>A. flavus</i>	31
1.10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	31
1.11	<i>Aspergillus niger</i>	32
1.12	Morfología de la levaduras	33
1.13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.1	Equipo FTIR SPECTRUM ONE marca PERKIN ELMER.	46
2.2	Equipo SEM modelo JSM-6060 LV marca Jeol	47
2.3	Equipo DMA 2980 marca TA INSTRUMENTS	48
2.4	Equipo DSC-TGA Simultaneo modelo SDT 2960 marca TA INSTRUMENTS	50
3.1	Aspecto de las películas quitosano-almidón	52
3.2	Aspecto de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales.	53
3.3	Aspecto de los mesofílicos aerobios.	53
3.4	Aspecto de una colonia de <i>P. notatum</i> .	54
3.5	Aspecto de una colonia de <i>A. fumigatus</i> .	54
3.6	Aspecto de una colonia de <i>A. niger</i> .	55
3.7	Aspecto de colonias de <i>S. cerevisiae</i> .	55
3.8	Zonas de crecimiento e inhibición de microorganismos en la caja petri.	56
3.9	Desarrollo de mesofílicos aerobios.	56
3.10	Desarrollo de <i>Penicillium notatum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Aspergillus niger</i> .	57
3.11	Desarrollo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	58
3.12	Espectros FTIR de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3.	62
3.13	Espectro FTIR de la película quitosano-almidón con extracto de té verde al 3% A1TV5.	63
3.14	Espectros FTIR de las películas quitosano-almidón con extracto de té negro al 3% A1TN0.5 y A3TN2.	64
3.15	Espectros FTIR de las películas quitosano-almidón con granada A1G0.5, A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2.	65
3.16	Espectros FTIR de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B5, A3B0.5 y A3B2.	66
3.17	Espectros FTIR de las películas quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5 y A1Ar5.	67

3.18	Micrografías de la película quitosano-almidón al 1% QA1 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	68
3.19	Micrografías de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	69
3.20	Micrografías de la película quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	69
3.21	Micrografías de la película quitosano-almidón con granada A1G2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	70
3.22	Micrografías de la película quitosano-almidón con granada A1G5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	70
3.23	Micrografías de la película quitosano-almidón con betabel A1B2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	71
3.24	Micrografías de la película quitosano-almidón con betabel A1B5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	71
3.25	Micrografías de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	72
3.26	Micrografías de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx	72
3.27	Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3.	74
3.28	Curva de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3.	75
3.29	Curvas del módulo de almacenamiento de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5.	75
3.30	Curva de $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5.	76
3.31	Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 y A3TN0.5.	77
3.32	Curva de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 y A3TN0.5.	78
3.33	Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con granada A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2.	79
3.34	Curvas de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón con granada A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2.	80

3.35	Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B0.5, A2B2, A2B5, A3B2 y A3B5.	81
3.36	Curva de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B0.5, A2B2, A2B5, A3B2 y A3B5.	82
3.37	Curva del módulo de almacenamiento de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5.	83
3.38	Curva de $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5.	83
3.39	Curvas TGA de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3	87
3.40	Termograma comparativo de la película A1TV5 contra QA1	88
3.41	Termograma comparativo de las películas quitosano-almidón A1TN0.5, A3TN2 contra QA1 y QA3	89
3.42	Termograma comparativo de las películas quitosano-almidón con granada A1G5, A3G5 contra QA1 y QA3	90
3.43	Termograma comparativo de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5 y A2B5 contra QA1 y QA2	91

Índice de tablas

Tabla	Descripción	Página
1.1	Características de algunos almidones usados en la industria alimentaria	10
1.2	Composición de la granada por 100 gramos de porción comestible	15
1.3	Composición de la arándano por 100 gramos de porción comestible	16
1.4	Composición del betabel por 100 gramos de porción comestible	17
3.1	Números y claves para identificar las películas durante la prueba antimicrobiana.	51
3.2	Películas que presentaron actividad antimicrobiana contra los mesofílicos aerobios, hongos y levaduras.	59
3.3	Muestras que se enviaron a diversas caracterizaciones.	61
3.4	Valores de E' de las películas quitosano-almidón a diferentes temperaturas	84
3.5	Valores máximos de $\tan \delta$ para las películas quitosano-almidón	85

Acrónimos

Acrónimo	Definición
A1Ar0.5	Película con almidón al 1% y 0.5% de jugo de arándano
A1Ar2	Película con almidón al 1% y 2% de jugo de arándano
A1Ar5	Película con almidón al 1% y 5% de jugo de arándano
A2Ar0.5	Película con almidón al 2% y 0.5% jugo de arándano
A2Ar2	Película con almidón al 2% y 2% de jugo de arándano
A2Ar5	Película con almidón al 2% y 5% de jugo de arándano
A3Ar0.5	Película con almidón al 3% y 0.5% de jugo de arándano
A3Ar2	Película con almidón al 3% y 2% de jugo de arándano
A3Ar5	Película con almidón al 3% y 5% de jugo de arándano
A1B0.5	Película con almidón al 1% y 0.5% de extracto de betabel
A1B2	Película con almidón al 1% y 2% de extracto de betabel
A1B5	Película con almidón al 1% y 5% de extracto de betabel
A2B0.5	Película con almidón al 2% y 0.5% de extracto de betabel
A2B2	Película con almidón al 2% y 2% de extracto de betabel
A2B5	Película con almidón al 2% y 5% de extracto de betabel
A3B0.5	Película con almidón al 3% y 0.5 % de extracto de betabel
A3B2	Película con almidón al 3% y 2% de extracto de betabel
A3B5	Película con almidón al 3% y 5% de extracto de betabel
A1G0.5	Película con almidón al 1% y 0.5% de jugo de granada
A1G2	Película con almidón al 1% y 2% de jugo de granada
A1G5	Película con almidón al 1% y 5% de jugo de granada
A2G0.5	Película con almidón al 2% y 0.5% de jugo de granada
A2G2	Película con almidón al 2% y 2% jugo de granada
A2G5	Película con almidón al 2% y 5% de jugo de granada
A3G0.5	Película con almidón al 3% y 0.5% de jugo de granada al
A3G2	Película con almidón al 3% y 25 de jugo de granada
A3G5	Película con almidón al 3% y 5% de jugo de granada
A1TN0.5	Película con almidón al 1% y 0.5% de extracto de té negro
A1TN2	Película con almidón al 1% y 2% de extracto de té negro
A1TN5	Película con almidón al 1% y 5% de extracto de té negro
A2TN0.5	Película con almidón al 2% y 0.5% de extracto de té negro
A2TN2	Película con almidón al 2% y 2% de extracto de té negro
A2TN5	Película con almidón al 2% y 5% de extracto de té negro
A3TN0.5	Película con almidón al 3% y 0.5% de extracto de té negro
A3TN2	Película con almidón al 3% y 2% de extracto de té negro
A3TN5	Película con almidón al 3% y 5% de extracto de té negro
A1TV0.5	Película con almidón al 1% y 0.5% de extracto de té verde
A1TV2	Película con almidón al 1% y 2% de extracto de té verde
A1TV5	Película con almidón al 1% y 5% de extracto de té verde
A2TV0.5	Película con almidón al 2% y 0.5% de extracto de té verde

A2TV2	Película con almidón al 2% y 2% de extracto de té verde
A2TV5	Película con almidón al 2% y 5% de extracto de té verde
A3TV0.5	Película con almidón al 3% y 0.5% de extracto de té verde
A3TV2	Película con almidón al 3% y 2% de extracto de té verde
A3TV5	Película con almidón al 3% y 5% de extracto de té verde
DMA	Análisis Dinámico Mecánico
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TGA	Análisis Termogravimétrico
QA1	Película de quitosano con almidón al 1%
QA2	Película de quitosano con almidón al 2%
QA3	Película de quitosano con almidón al 2%

Introducción

La presencia de microorganismos es uno de los problemas más serios en diversas áreas como la farmacéutica, médica, textil, alimenticia y en los sistemas de tratamiento de aguas. Estos microorganismos producen descomposición de los alimentos, enfermedades en el ser humano, plantas y animales generando pérdidas económicas y problemas de salud cada año.

Para resolver esta problemática se ha recurrido al uso de agentes antimicrobianos, ya sean de origen natural o sintético. Los agentes antimicrobianos son aquellos materiales capaces de eliminar microorganismos patógenos.

Desde el punto de vista práctico existen distintos tipos de antimicrobianos: desinfectantes, sanitizantes, antisépticos, de uso sistémico.

Los agentes antimicrobianos de uso sistémico se pueden clasificar según su origen, efecto antimicrobiano, espectro de actividad y mecanismo de acción. Pueden ser de origen natural, sintético ó semisintético con un espectro de actividad amplio, intermedio, reducido. [1]

Los antimicrobianos de uso sistémico deben reunir las siguientes características:

- Deben mantenerse activos en presencia de plasma y líquidos corporales.
- Es deseable que sean efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos.
- Los microorganismos susceptibles no se deben volver resistentes genética o fenotípicamente.
- No deben ser tóxicos y los efectos colaterales adversos tienen que ser mínimos para el huésped.
- La concentración activa frente a los microorganismos se debe alcanzar con rapidez y debe mantenerse durante un tiempo prolongado.
- Deben ser hidrosolubles y liposolubles.

Entre estos agentes antimicrobianos se encuentra el quitosano, que es un polisacárido natural, biodegradable y biocompatible, que se obtiene principalmente a partir de la quitina, sustancia muy abundante en la naturaleza. Debido a esta circunstancia y a su baja toxicidad,

se puede utilizar como excipiente de uso farmacéutico y también aprovechar las acciones biológicas o farmacológicas que presenta por sí mismo. Las acciones como hipocolesterolemiantes, antimicrobiano y cicatrizante de heridas son algunos de los posibles usos terapéuticos del quitosano. [2]

En el desarrollo de este proyecto se sintetizaron películas de quitosano y almidón, añadiendo como innovación el uso de antioxidantes de origen natural como las catequinas y antocianinas, conocidos por sus excelentes propiedades antimicrobianas, presentes en alimentos y bebidas como granada, betabel, arándano, té verde y té negro.

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

Las propiedades termomecánicas de las películas fueron evaluadas mediante Análisis Termogravimétrico (TGA) y Análisis Dinámico Mecánico (DMA). Las características químicoestructurales y morfológicas fueron evaluadas mediante Espectroscopía Infrarroja (IR) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) respectivamente.

De esta manera el presente trabajo contempla en el capítulo 1 los fundamentos teóricos relacionados con las características del quitosano y los antioxidantes naturales presentes en los productos naturales y diferentes microorganismos. El capítulo 2 muestra la metodología desarrollada en la síntesis y caracterización de las películas quitosano-almidón, así como generalidades de las técnicas utilizadas en el análisis de las películas. El capítulo 3 presenta los resultados obtenidos en cada una de las caracterizaciones y los resultados de las pruebas antimicrobianas, así como la discusión de estos resultados. En el capítulo 4 se exponen las conclusiones obtenidas en bases a los resultados observados en los diferentes análisis realizados a las películas.

Capítulo 1.- Fundamento Teórico

1.1.- Películas biocidas

Durante los últimos años, la propagación de enfermedades infecciosas, especialmente aquellas causadas por agentes patógenos resistentes a los fármacos, ha tenido una creciente preocupación mundial. Los materiales poliméricos juegan un papel muy importante en la transmisión de enfermedades debido a que los microorganismos tienen mayores habilidades para sobrevivir en materiales poliméricos ordinarios, haciendo de los polímeros una fuente potencial de contaminación. El desarrollo de polímeros biocidas, que son polímeros que pueden inactivar o eliminar patógenos infecciosos mediante contacto, ha atraído el interés de los investigadores. [1]

La contaminación por microorganismos tiene lugar en una gran variedad de áreas, tales como dispositivos médicos, sistemas de purificación de agua, equipo de oficina, empaçado y almacenamiento de alimentos.

Los agentes antimicrobianos de bajo peso molecular son usados para la esterilización de agua, como preservadores de alimentos, medicamentos antimicrobianos y esterilización de suelos. Sin embargo, tienen una toxicidad residual que limita su uso.

Varios tipos de plásticos son usualmente esterilizados mediante calor húmedo o seco, o por radiación ionizante. Sin embargo, estos polímeros pueden ser contaminados al ser expuestos a la atmósfera. Por lo tanto, hay una necesidad definitiva de nuevos materiales con actividad antimicrobiana. La solución a este problema es la obtención de métodos para la producción de biomateriales resistentes a la colonización microbiana. Los polímeros antimicrobianos pueden proveer una forma muy conveniente de solucionar este problema.

El uso de polímeros biocidas promete mejorar la eficiencia de algunos agentes antimicrobianos existentes y minimizar el problema ambiental que representa su toxicidad residual, incrementa la selectividad y eficiencias de estos agentes. También tienen la ventaja de que no son volátiles, son químicamente estables y no se permean a través de la piel. Por lo tanto, se pueden reducir las pérdidas asociadas con la volatilización,

descomposición fotolítica de los agentes, y transportación incrementando su eficiencia y selectividad.

Un método de obtención de polímeros biocidas es la adición de un biocida orgánico o inorgánico al polímero durante el procesamiento del material. Otro método es dotar al polímero de una función biocida después del procesamiento. Esto se lleva a cabo mediante la preparación de un monómero polimerizable que contiene biocida y polimerizarlo subsecuentemente ó bien, copolimerizarlo con otro monómero.

El polímero biocida ideal debe tener las siguientes características: síntesis barata y fácil, estable en uso a altas temperaturas y en almacenamiento a su temperatura de aplicación, no ser soluble en agua para aplicación en desinfección de agua, no descomponerse y/o emitir productos tóxicos, no ser tóxico o irritante para quien lo maneje, que pueda ser regenerado sobre la pérdida de actividad, y ser biocida para un amplio espectro de microorganismos patógenos en cortos tiempos de contacto.

Hay muchos factores que pueden afectar la actividad biocida y el mecanismo de actividad de los polímeros, tales como peso molecular, el balance hidrofóbico- hidrofílico y la naturaleza del contraión.

Los mayores campos de aplicación de los polímeros biocidas son: tratamientos de agua, productos para cuidado de la salud y medicamentos, aplicaciones en alimentos y productos textiles. [3]

1.2.- Generalidades de los materiales

Unos de los polímeros que en la actualidad ha mostrado notables propiedades biocidas es el quitosano. No obstante, constantemente se presentan datos de su modificación para mejorar sus propiedades mecánicas, pretendiendo también mejorar su efecto biocida.

1.2.1.- Quitosano

El quitosano (Figura 1.1) es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina

(unidad acetilada). Esta sustancia tiene una gran cantidad de aplicaciones comerciales y biomédicas. Se descubrió en el año 1859 debido al tratamiento de la quitina.

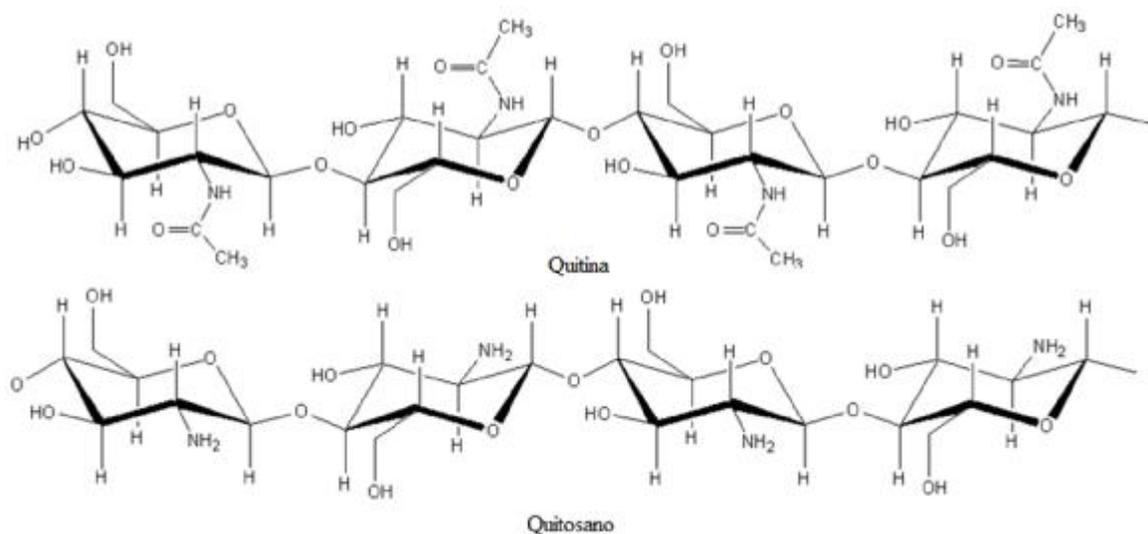


Figura 1.1.- Estructuras químicas de la quitina y el quitosano.

La quitina (del griego *tunic*, envoltura) se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y es el segundo polisacárido en abundancia. Sus fuentes principales son el exoesqueleto (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas), paredes celulares de hongos, algas, etc. [4]

El quitosano se produce comercialmente mediante la deacetilación de la quitina. El grado de deacetilación (%DA) en el quitosano está en el rango de 60-100 %. El grupo amino en el quitosano tiene un valor pKa que ronda los 6.5, por esta razón el quitosano posee una ligera carga positiva y es soluble en medios ácidos o en soluciones neutras con dependencia de carga del pH y del valor %DA.

Se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos (por ejemplo en el *Mucor rouxii* llega a representar hasta un tercio de su peso). Sin embargo, la fuente más importante de quitosano, a nivel industrial, lo constituye la quitina, la cual, mediante el proceso de deacetilación química o enzimática, ha permitido producirlo a gran escala (Figura 1.2).

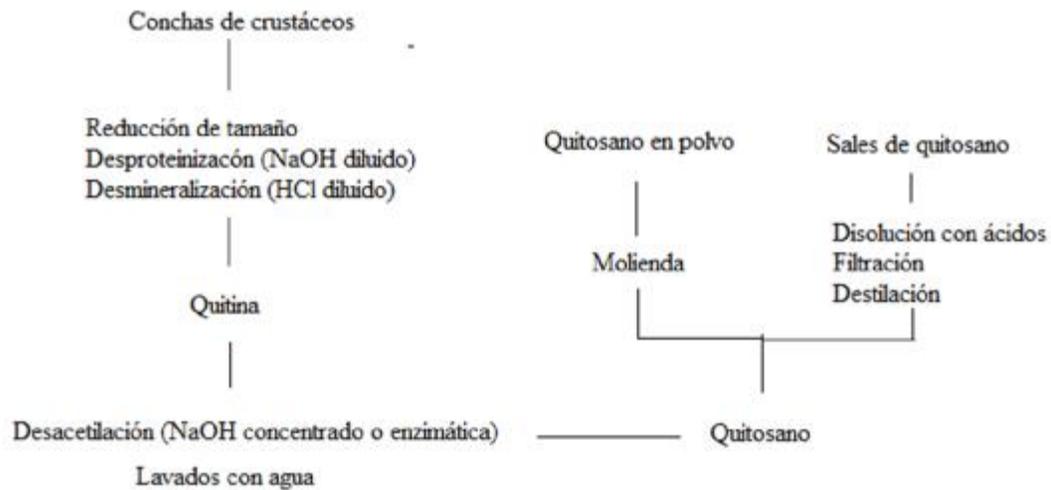


Figura 1.2.- Esquema de la obtención de quitina y quitosano a partir de crustáceos.

El quitosano es un adhesivo biocompatible y biodegradable. Las cualidades de purificación de los quitosanos están disponibles en aplicaciones biomédicas. Dado su bajo índice de toxicidad y su abundancia en el medio ambiente, no es de esperar que el quitosano dañe al organismo ni a los animales. [5]

Algunas de las principales aplicaciones que tiene actualmente este material se desglosan por áreas:

- a) Agricultura: Recubrimiento de semillas con películas de quitosano para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, agente bactericida y fungicida para la protección de plántulas (inicio de las plantaciones).
- b) Medicina: Producción de suturas quirúrgicas a partir de quitina, producción de gasas y vendajes tratados con quitosano, cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras.
- c) Tratamiento de aguas: Coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad, floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado, captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas.

d) Cosméticos: Fabricación de cápsulas para adelgazar, aditivo bactericida en jabones, shampoos, cremas de afeitar, cremas para la piel, pasta dental, etc., agente hidratante para la piel, debido a que sus geles pueden suministrar agua y evitar la resequedad.

e) Biosensores: Sensor para glucosa en sangre humana, basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre quitosano, sensor para la detección de fenoles en aguas de desecho en plantas industriales, basado en la inmovilización de la enzima tirosinasa⁵, sensores basados en la inmovilización de nanopartículas espacialmente ordenadas. [6]

1.2.2.- Almidón

Como se mencionó anteriormente, 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 1.3) es formado por dos compuestos, la α -amilosa y la amilopectina. La amilosa está constituida por cadenas largas no ramificadas, en las que todas las unidades de D-glucosa se hallan unidas mediante enlaces α -1,4. Las cadenas son polidispersas y varían en peso molecular. La amilosa (similar a celulosa) no es verdaderamente soluble en el agua, pero forma micelas hidratadas que dan un color azul con el yodo. En tales micelas la cadena polisacárida está retorcida, constituyendo un arrollamiento helicoidal. La amilopectina está muy ramificada, la longitud media de las ramificaciones es de 24 a 30 residuos de glucosa, según las especies. Los enlaces glucosídicos del esqueleto son α -1,4, pero los de los puntos de ramificación son α -1,6. La amilopectina produce disoluciones coloidales o micelares que dan una coloración rojo violácea con el yodo. Su peso molecular puede llegar hasta 100 millones.

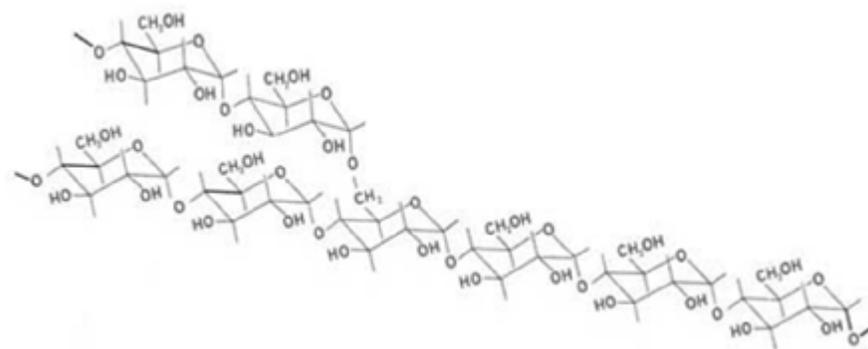


Figura 1.3.- Estructura química del almidón.

Los componentes principales del almidón pueden ser hidrolizados enzimáticamente por dos métodos diferentes. La amilosa puede hidrolizarse por la α -amilasa. Esta enzima está presente en el jugo pancreático y la saliva, participa en la digestión del almidón en el tracto gastrointestinal. Puede ser hidrolizada también por β -amilasa, presente en la malta. La amilopectina es atacada también por la α - y β -amilasa. [7]

Estos dos tipos de componentes se pueden separar uno de otro. El peso molecular del almidón oscila entre 50000 y varios millones. El almidón natural se presenta en forma de gránulos visibles al microscopio, que se tiñen de un color negro-azulado al contacto con el yodo. Cuando esta pulverizado se dispersa en el agua, pudiéndose preparar por este medio soluciones que son claras. Se supone que durante este tratamiento la molécula se degrade.

El almidón se hidroliza fácilmente por los ácidos minerales diluidos, dando como producto final glucosa con rendimiento cuantitativo. El curso de la hidrólisis se puede seguir por el cambio gradual de color producido por el yodo (negro-azulado \rightarrow púrpura \rightarrow rojo \rightarrow ninguno) y por aumento de la concentración de azúcares reductores. Las enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón, amilasas, se dividen en dos clases conocidas como α - y β -amilasas. En la dieta de los mamíferos, el almidón representa un 60% de los carbohidratos. [8]

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 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 1.4) 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.

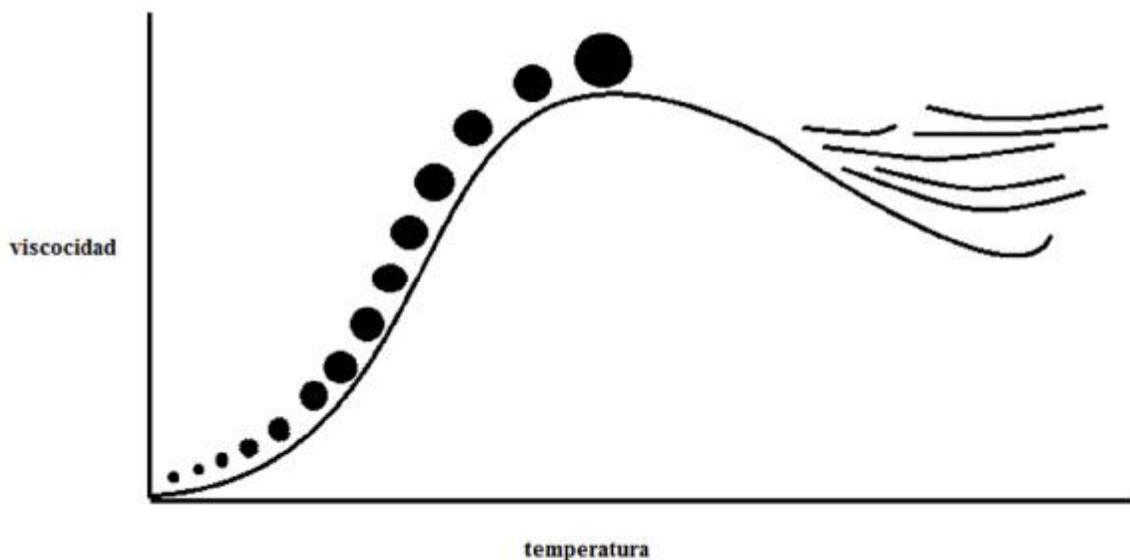


Figura 1.4.- Gelatinización del almidón, los gránulos se hinchan y retienen un máximo de carga hasta que se rompen y producen una dispersión de moléculas de amilosa y amilopectina.

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.

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
Papa	78	22	58-67	5-100
Arroz	83	17	62-78	2-5
Tapioca	82	18	51-65	5-35
Maíz céreo	99-100	0-1	63-72	5-25
Sorgo céreo	99-100	0-1	67-74	5-25
Trigo	76	24	58-64	11-41

Como se mencionó en la parte introductoria, las películas de quitosano-almidón son sintetizadas utilizando extractos de diferentes productos naturales, los cuales son descritos a continuación así como las características de los antioxidantes que contienen.

1.2.3.- Té verde

El té verde es una de las bebidas más antiguas del mundo. Durante siglos, permaneció como la bebida de preferencia en los países asiáticos. No fue hasta el siglo XVI que los exploradores europeos y comerciantes popularizaron el té en Occidente.

El té verde es consumido mayoritariamente en los países asiáticos (China, Japón e India). China es el principal productor del té verde. Existen numerosas variedades de té verde, todas ellas muy populares en China y Japón.

El té verde procede de la planta *Camellia sinensis*, y se obtiene secando las hojas por acción del vapor (sistema japonés) o por el calentamiento (sistema chino). Estos procesos casi no alteran su composición química. Las hojas del té verde no se dejan fermentar después de cosechado y antes del proceso de secado, para que retenga los ingredientes activos de la planta (polifenoles).

Los polifenoles son esenciales en la fisiología de las plantas, para la pigmentación, crecimiento, reproducción y protección contra plagas. Algunos de los polifenoles dependen de la luz solar, por lo tanto, se encuentran en mayor concentración en las hojas y partes externas de la planta. Muchos de ellos han sido estudiados en la prevención del cáncer por su capacidad antioxidante. Entre ellos se encuentran: flavonas, isoflavonas, flavonoides, catequinas y taninos. El contenido de polifenoles varía en las diferentes plantas. El té verde contiene cuatro polifenoles, comúnmente llamados catequinas.

Sus componentes antioxidantes le atribuyen diversas propiedades saludables a esta planta:

- Protege al organismo frente a la acción nociva de las sustancias oxidantes y las radicales libres que debilitan al sistema de defensa natural del cuerpo, y aceleran el proceso de envejecimiento.
- Contribuye a regular los niveles de colesterol.
- Evita la formación coágulos en la sangre, ya que inhibe una sustancia liberada por las plaquetas, el tromboxano, que provoca que las plaquetas se unan formando bloques (trombos).

- Previene contra la formación de caries, debido a su contenido de fluoruro.
- Ejerce un importante efecto diurético en la medida que su ingestión ayuda a la eliminación de líquidos.
- Su bajo contenido calórico lo convierten en una buena alternativa a las bebidas gasificadas y azucaradas, especialmente recomendable para quienes se aburren por tenerse que ceñir al consumo de agua.
- Contribuye a la hidratación de la piel dado que permite la oxigenación de las células y de los capilares.
- Ciertos componentes del té, los taninos, que le confieren el característico sabor amargo, tienen efecto astringente, por lo que su consumo está aconsejado en caso de diarrea.
- Como el café, el té es una buena bebida estimulante aunque si el consumo es desmedido, altera los nervios.

No obstante, no todo son ventajas. El té contiene una sustancia que impide el aprovechamiento orgánico de la vitamina B1. Por ello, los grandes bebedores de té pueden llegar a padecer deficiencia de esta importante vitamina para el sistema nervioso. Por otra parte, el té verde tiene el inconveniente de dificultar la absorción de hierro presente en los alimentos, por lo que su consumo no estaría indicado en caso de estar atravesando un proceso anémico.

Los análisis realizados al té verde por Romburg y Lohman determinaron que el té verde presenta 16.8% de taninos mientras que los estudios realizados por J. M. Eder determinaron que presenta el 17.4%. [10]

1.2.4.- Té negro

El té negro es el más conocido y consumido en todo el mundo. Procede del mismo árbol que el té verde, pero existe una gran diferencia entre ellos, ya que el té negro tiene un sabor y aspecto diferente porque éste ha sido fermentado. Además es precisamente su proceso de fermentación lo que le convierte en uno de los té más aromáticos.

Es muy rico en minerales como fósforo, flúor, potasio, magnesio, hierro, manganeso. Una taza de té aporta unos doscientos miligramos de flavonoides. Entre sus propiedades están:

- Tiene efectos beneficiosos para la salud, aunque estos no sean tan extensos como el té verde.
- Previene de enfermedades cardíacas y de accidentes vasculares cerebrales.
- Ayuda a purificar el cuerpo, ayudando al hígado a trabajar.
- Tiene propiedades antioxidantes.
- Tiene taninos astringentes que pueden ayudar a aliviar las inflamaciones cutáneas.
- Ayuda a combatir insolaciones.
- Es también calmante y tranquilizante sobre el estómago, especialmente para la diarrea.
- Endurece el esmalte dental.
- Mejora la capacidad de dilatación y contracción de los vasos sanguíneos.
- Ayuda a controlar el nivel de colesterol.
- Está indicado para aplicarlo con compresas frías en casos de conjuntivitis o vista cansada y para disminuir las bolsas de los ojos y las ojeras.
- Por su alto contenido en teína es indicado para aliviar la fatiga y los dolores de cabeza provocados por el cansancio

Los análisis realizados al té negro por Romburg y Lohman determinaron que el té verde presenta 15.2% de taninos. Los estudios realizados por J. M. Eder determinaron que presenta el 10.4%. [10]

1.2.5.- Granada

La granada es el fruto del árbol denominado granado, que alcanza los cuatro metros de altura y que proviene de una pequeña familia de árboles y arbustos llamada Punicáceas. Es nombrada también como milgrano, minglana, balaustra y manglano.

El cultivo de este fruto se extiende por diversos países de Europa, Asia y América, destacando España como uno de los principales productores del mundo y el mayor exportador europeo. México, a pesar de no ser consumidor potencial de este fruto, se logra obtener la granada en grandes cantidades dentro del estado de Hidalgo, principalmente en el Valle del Mezquital.

La granada es un producto natural que, por sus propiedades nutritivas, ha generado un gran impacto dentro del ámbito de la salud debido a que contiene un bajo valor calórico, pues tiene un escaso contenido en hidratos de carbono y está compuesta, en su mayor parte, por agua.

Recientes investigaciones han atribuido a este alimento grandes capacidades medicinales que amplían el uso y consumo de los granos, los cuales guardan poderosos nutrientes entre los que destacan: flavonoides, pigmento de origen vegetal al que se debe el color rojizo de sus granos y que posee una intensa actividad antioxidante; potasio, mineral que ayuda a reducir la tensión arterial y problemas musculares; vitamina A, calcio y fósforo, sustancias astringentes antiinflamatorias que favorecen a las actividades digestivas.

Ayuda a combatir enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y gastrointestinales, entre otras. Además presenta una mayor capacidad antioxidante que el té verde o el vino. El consumo cotidiano y prolongado de este producto tiene un efecto importante sobre los niveles de glucosa. El jugo fresco de granada tiene una actividad antimicrobiana del 20% y que, comparado con jugos comerciales, tiene mayor cantidad de magnesio, manganeso, cobre, zinc y vitaminas B, C y E. Se estudia actualmente el uso de la granada en casos de cirrosis y se ha encontrado que tiene propiedades diuréticas. En la tabla 1.2 se muestra la composición de la granada. [11]

Tabla 1.2.- Composición de la granada por 100 gramos de porción comestible.

Componente	Cantidad
Calorías	3.8
Hidratos de carbono (g)	7.5
Fibra (g)	0.2
Vitamina C (mg)	5.7
Provitamina A (mcg)	3.5
Potasio (mg)	275
Magnesio (mg)	3
Calcio (mg)	8

mcg= microgramos

1.2.6.- Betabel

Hortaliza originaria de la zona costera del norte de África. La planta tiene una raíz gruesa carnososa, jugosa. Sus hojas son grandes, ovales, tiernas, etc. La remolacha 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. Es buena fuente de fibra.

La remolacha 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.

Gracias a la abundancia de potasio e inferior contenido de sodio, poseen una acción diurética que favorece la eliminación del exceso de líquidos del organismo.

Son beneficiosas en caso de hipertensión, hiperuricemia y gota, cálculos renales (salvo de oxalato de calcio), retención de líquidos y oliguria. Con el aumento de la producción de orina se eliminan, además de líquidos, sustancias de desecho disueltas en ella como ácido úrico, urea, etc. En la tabla 1.3 se muestra la composición del betabel. [12]

Tabla 1.3.- Composición del betabel por 100 gramos de porción comestible.

Componente	Cantidad
Energía (kcal)	30
Proteínas (g)	88.8
Hidratos de carbono (g)	6.4
Fibra (g)	3
Potasio (mg)	300
Yodo (mcg)	40
Sodio (mcg)	66
Folatos (mcg)	90
Vitamina B3 (mcg de eq. de retinol)	0.4
Vitamina C (mg)	5

mcg= microgramo

1.2.7. – Arándano

Es una fruta nativa del norte de Europa, norte de Asia y Norteamérica. Contiene más glucosa que fructosa. Tiene altos niveles de varios ácidos, como el ácido málico, cítrico, benzoico. Es una baya esférica, redonda u oval. Son buena fuente de fibra que mejora el tránsito intestinal, y de potasio, hierro y calcio, taninos de acción astringente, además de que contiene vitamina C.

Sin embargo, lo que en realidad caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales (antocianinas) de acción antioxidante. Estos compuestos neutralizan la acción de los radicales libres, tienen efectos antiinflamatorios y acción antibacteriana, potencia el

sistema inmunológico y contribuye a reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares e incluso del cáncer.

El consumo de arándano también combate infecciones urinarias, piedras en el riñón y mejora la circulación periférica. En la tabla 1.4 se muestra la composición del arándano. [13]

Tabla 1.4.- Composición del arándano por 100 gramos de porción comestible.

Componente	Cantidad
Calorías	30.1
Hidratos de carbono (g)	6.9
Fibra (g)	1.8
Vitamina C (mg)	88
Provitamina A (mcg)	0.5
Potasio (mg)	12
Magnesio (mg)	17
Calcio (mg)	5

mcg= microgramos

1.3.- Antioxidantes naturales

Existen muchas sustancias que se encuentran naturalmente 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 de enfermedades neurodegenerativas. También actúan potenciando el sistema inmunológico.

A estas sustancias se les conocen como antioxidantes, algunos de ellos se enlistan a continuación:

Vitamina E y los tocoferoles.- Son antioxidantes lipídicos más importantes gracias a su capacidad para captar el oxígeno. Se encuentran en aceites vegetales, semillas, mantequilla, coco, germen de trigo, etc.

Vitamina C.- Actúa como antioxidante. Los alimentos con una mayor riqueza en esta vitamina son las frutas cítricas.

Vitamina A y carotenoides.- Solo está presente como tal en los alimentos de origen animal, mientras que en los vegetales se encuentra como provitamina A, en forma de carotenos. Los carotenoides forman un grupo de más de 600 compuestos que se encuentran de forma natural en las plantas y les proporcionan diferentes coloraciones. El carotenoide más conocido es el betacaroteno. Se encuentra en vísceras de animales, zanahorias, mantequilla, aceite de soya, atún, etc.

El licopeno es el carotenoide que imparte el color rojo al tomate y a la sandía y que no se convierte en vitamina A en el organismo humano, lo que no impide que posea unas propiedades antioxidante muy elevadas.

Otros potentes antioxidantes son minerales como el cobre, manganeso, selenio, cinc y hierro. Estos minerales ejercen su función antioxidante en diversos procesos y pasos metabólicos en el organismo. [14]

Los fenólicos son compuestos ampliamente distribuidos en vegetales, frutas, cereales, oliva, legumbres, chocolate y bebidas (té, café, cerveza y vino). Son parcialmente responsables de las propiedades organolépticas de estos alimentos. Contribuyen a la astringencia y sabor ácido o amargo de las frutas y sus jugos. Son componentes con uno ó más anillos aromáticos ó grupos hidroxilos. Son considerados antioxidantes poderosos, incluso más que los carotenoides y las vitaminas C y E. Actúan como inactivadores de radicales libres o también como agentes quelantes de metales prooxidantes, como es el caso del hierro y del cobre. Su consumo se asocia con la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, etc.

Las antocianinas son responsables de los colores naranja, rojo, azul y morado de frutas y vegetales. Los taninos son otro grupo de polifenoles y se subdividen en los tipos: taninos hidrolizables y taninos condensados.

Algunos de los más importantes colorantes naturales con actividad antioxidante son las catequinas y antocianinas, las cuales son objeto de estudio de este proyecto debido a sus propiedades biocidas y antisépticas, y naturaleza hidrosoluble, así como por su abundancia en la naturaleza. [15]

1.3.1- Catequinas

Las hojas frescas del árbol del té contienen una alta cantidad de flavanoles (derivados de los flavonoides) de estructura monomérica, conocidos como catequinas, y también formas polimerizadas de las catequinas.

Las principales catequinas presentes en el té son la epicatequina (EC), la epigalocatequina (EGC), la epicatequina galato (ECG), y la epigalocatequina galato (EGCG), siendo esta última la catequina más abundante en el té y la que concita mayor interés e investigación.

Cuando las catequinas toman contacto con las polifenoloxidasas, como ocurre cuando se enrollan las hojas del té para la producción del té verde y del té negro, la oxidación produce estructuras diméricas y poliméricas de los flavanoles dando origen a las teaflavinas (estructuras diméricas) y a las tearrubiginas (estructuras poliméricas), que son los derivados que le aportan el color y sabor característico al té negro. De esta forma, el té verde contiene una alta concentración de catequinas y baja cantidad de teaflavinas y tearrubiginas, y el té negro contiene bajas cantidades de catequinas y alto contenido de los dímeros y polímeros. Esta diferente composición es responsable, principalmente, de los diferentes efectos fisiológicos atribuidos a los tres tipos de té de mayor consumo, ya que también existen otras formas de té (blanco, aromático, entre otras) de menor consumo. La Figura 1.5 muestra la estructura química de las catequinas que contiene el té. [16]

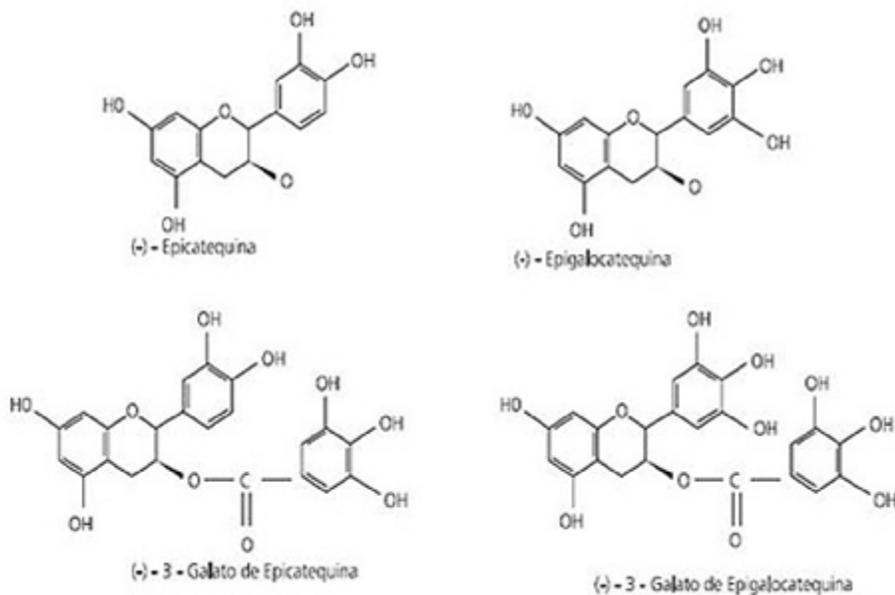


Figura 1.5.- Estructura química de las catequinas presentes en el té.

De los polifenoles totales del té, el 59.9% lo constituyen las catequinas. La composición del té puede variar según la especie, el método de cultivo, la estación del año y edad de la planta.

Por ejemplo, en el té verde las catequinas representan un 80-90% de los flavonoides, mientras que en el té negro esta proporción es de 20-30%. En general, las hojas más jóvenes tienen menos catequinas. La forma de preparar la infusión también influye, ya que temperaturas elevadas producen una disminución de la concentración de catequinas, por lo que es preferible dejar enfriar el agua antes de introducir las hojas del té. Las catequinas del té verde son solubles en agua, por lo que el grado de extracción de éstas depende del tiempo de contacto de las hojas con el agua. [17]

1.3.2.- Antocianinas

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula.

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 carbonos. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Figura 1.6).

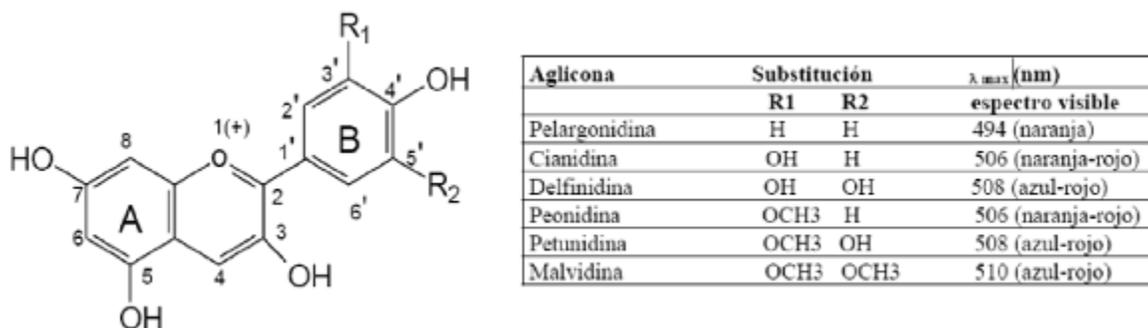


Figura 1.6.- Estructura y sustituyentes de las antocianinas.

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa.

Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzoico.

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja

estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento. Factores como su misma estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento. [18]

Las antocianinas son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino. En medio ácido la forma predominante es la del ion flavilio, el cual da el color rojo, cuando esta es sometida a pH básico o alcalino, el ión flavilio es susceptible al ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose la pseudobase carbinol, esto es a pH 4.5 y seguido se forma la calcona, las dos formas son incoloras. Conociendo esto, las antocianinas tienen su máxima expresión de color a pH ácidos (pH=1), y su forma incolora se produce a pH neutros o alcalinos, debido a esta característica se utilizan a las antocianinas a pH ácido o ligeramente neutro en la industria alimenticia.

La antocianina es destruida por el calor durante el procesamiento y almacenamiento. Un incremento logarítmico en la destrucción de la antocianina ocurre con un incremento en la temperatura.

Las antocianinas poseen conocidas propiedades farmacológicas utilizadas para la terapia de un amplio espectro de enfermedades. Por otro lado se ha observado que su potencial antioxidante va en contra de radicales superóxidos y peróxidos de hidrógeno a través de numerosos mecanismos. La capacidad antioxidante se relaciona con el número de grupos –OH que presenten y el lugar de la sustitución.

Cuando se ingieren, las antocianinas son destruidas en parte por la flora intestinal y las que son absorbidas se eliminan por la orina y la bilis, con previas transformaciones. Varios trabajos reportan sus efectos benéficos al prevenir la proliferación de células cancerígenas, protección contra enfermedades del corazón y prevención del daño a lípidos de alimentos.

Los alimentos que contienen antocianinas son: arándanos, ciruelas, higos, maracuyá, mora, uvas, moras azules, cerezas, frambuesas, fresas, granada, manzana roja, sandía, pimiento rojo, rábano, tomate, betabel, col morada, berenjena. [19]

1.4.- Microorganismos

Los microorganismos representan probablemente una de las formas más antiguas de seres vivos. Se pueden encontrar microorganismos en cualquier punto donde sea posible la vida.

Estos organismo, invisibles de ordinario, abundan no sólo en el suelo, aguas residuales y vegetación, sino también en el polvo, en el aire, en lo alimentos y en el agua. Más aún, grandes cantidades viven constantemente en la piel y en otras superficies del cuerpo. El único lugar en que los microorganismos no se encuentran normalmente es en el interior de los tejidos sanos del cuerpo vivo.

Se sabe que no todos estos microorganismos, esparcidos por todas partes pueden causar enfermedades. La mayor parte realiza funciones útiles al ser humano y algunos, desempeñan un papel indispensable en la naturaleza.

Algunos de los microorganismos que existen en la actualidad parecen representar formas extremadamente simples y primitivas de vida, como sucede con ciertos tipos de bacterias. Sin embargo, otras especies actuales, especialmente los microorganismos que causan enfermedades transmisibles en el hombre y los animales, difícilmente pueden considerarse como seres primitivos, ya que muestran adaptaciones extraordinarias a un modo particular de vida, asociado con huéspedes vivos, cosa que sólo puede ser resultado de una larga evolución.

Se cree que los microorganismos han existido desde el comienzo de la vida en la Tierra hace aproximadamente 3000 millones de años, aunque algunas especies parásitas y patógenas pueden representar un desarrollo relativo reciente. [20]

1.4.1.- Bacterias

Se han descrito miles de especies de bacterias. Son organismos celulares procariotas. Son muy pequeñas. Típicamente, su diámetro va de 0.5 a 1 micrómetro (μm). La mayor parte son organismos unicelulares, pero algunas forman colonias o filamentos que contienen células especializadas.

Aunque muchas especies tienen formas irregulares, las bacterias presentan tres formas comunes: esférica, cilíndrica y espiral (Figura 1.7). Las bacterias esféricas, llamadas cocos, se encuentran separadas en algunas especies y forman grupos independientes uno de otro. Las bacterias con forma cilíndrica o de barra, llamadas bacilos, pueden estar aisladas o como largas cadenas. Las que forman una hélice corta se llaman vibriones. Las que forman una hélice más grande se llaman espirilos si son rígidas, y como espiroquetas si son flexibles. La forma es un criterio importante para identificar especies bacterianas.

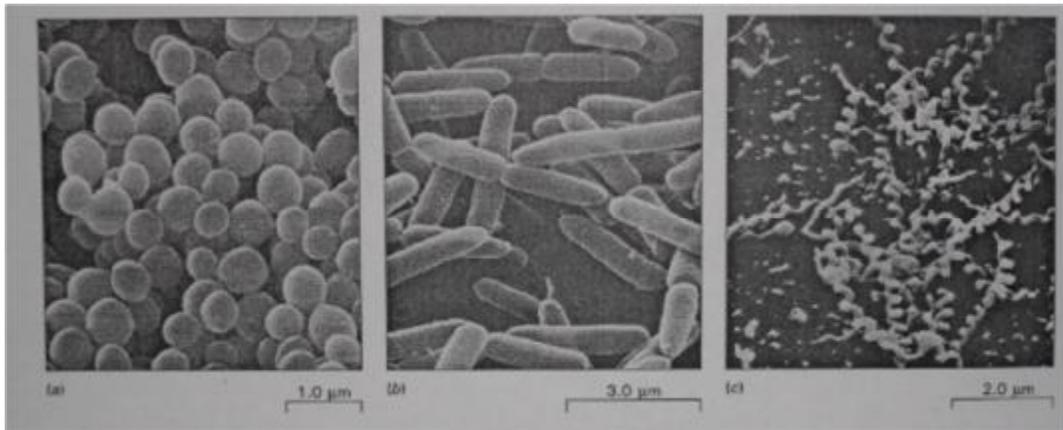


Figura 1.7.- Formas comunes de las bacterias. a) SEM de *Micrococcus*, bacteria esférica o coco. b) SEM de *Salmonella*, un bacilo. c) SEM de *Spiroplasma*, bacteria espiral o helicoidal.

En 1888, el médico danés Christian Gram desarrolló el procedimiento de tinción que lleva su nombre. Las bacterias que absorben y retienen el pigmento llamado violeta de cresilo durante este proceso se denominan grampositivas (con paredes celulares muy gruesas y consistentes en su mayoría de peptidoglucano), en tanto las que no lo retienen cuando se aclaran con alcohol son gramnegativas (con pared celular de dos capas, una con peptidoglucano y la otra con polisacáridos unidos a lípidos). Esta distinción es importante para tratar determinadas enfermedades.

Las bacterias se reproducen de manera asexual, por lo común mediante fisión binaria (proceso en el cual una célula se divide en dos de menor tamaño). También se reproducen por gemación y por fragmentación. Aunque las bacterias no se reproducen sexualmente, algunos individuos intercambian material genético.

Las bacterias son heterótrofas o autótrofas. La mayor parte son heterótrofas. Casi todas las bacterias heterótrofas son saprofitas. Otras bacterias heterótrofas obtienen nutrientes de organismos vivos, causándoles enfermedades, y en otros casos aportando un beneficio. Las bacterias autótrofas son fotosintéticas o quimiosintéticas y producen sus propias moléculas a partir de materiales simples. La mayor parte de las células bacterianas son aerobias (requieren oxígeno), algunas son anaerobias facultativas (pueden utilizar oxígeno, si se dispone de él, pero metabolizan en forma anaerobia si es necesario). Otras bacterias son anaerobias obligatorias o estrictas, es decir, sólo actúan de forma anaerobia.

Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima. Además de los indicados existen organismos hipertermófilos que pueden crecer a temperaturas cercanas o incluso superiores a 100°C en condiciones de alta presión.

Pocas bacterias son patógenas en plantas y animales. Todos los vegetales y animales alojan una población de microorganismos que se considera microflora normal (bacterias simbióticas inocuas).

De hecho, el número de bacterias que habitan normalmente en el cuerpo humano excede el número de las propias células humanas. La presencia de estas poblaciones impide que proliferen los microorganismos nocivos. Estos causan enfermedades sólo en determinadas ocasiones. Los patógenos ingresan en el cuerpo por medio de alimentos, polvo, microgotas o lesiones en la piel. Otros son transmitidos por picaduras de insectos o mordeduras de animales. Para causar enfermedad, los patógenos deben adherirse a una célula específica, multiplicarse y producir toxinas. Es la toxina, no la presencia de la bacteria, la que causa la enfermedad.

Muchos alimentos y bebidas se producen por fermentación microbiana, como en el caso del yogurth, leche acidófila, encurtidos, aceitunas, col agria, queso, salami, vinagre, salsa de soya, chocolate, ácido cítrico y vitaminas del complejo B. también se producen antibióticos, compuestos e insulina. También se emplean en el tratamiento de aguas residuales y desechos sólidos en rellenos sanitarios. [21]

1.4.1.1.- Mesofílicos aerobios

Muchas de las bacterias más estudiadas son mesofílicas, y pertenecen a dos subdivisiones bastantes 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. Crecen en presencia de aire. [22]

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.

También indican que se han dado las condiciones que podrían favorecer el crecimiento de ciertos organismos patógenos, los cuales también estarían 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. [23]

1.4.2.- Hongos

Los hongos constituyen un grupo de microorganismos de gran interés práctico y científico para los microbiólogos. Son heterótrofos pues como saprofitos obtienen su alimento de la materia orgánica o como parásitos se alimentan de huéspedes. Como saprofitos destruyen plantas y restos de animales degradándolos a formas químicas simples que pasan a formar parte del suelo y, finalmente, son absorbidas por otras generaciones de plantas. Esta actividad de los hongos es en gran parte, la causa de la mayor o menor fertilidad de la

tierra. Los hongos no sólo descomponen los cereales, sino que también producen venenos (micotoxinas) muy tóxicos y en algunos casos, carcinogénicos (productores de cáncer).

Los hongos también son importantes en las fermentaciones industriales de las cervecerías y vinaterías, en la producción de antibióticos (penicilina), vitaminas y ácidos orgánicos (ácido cítrico). También dependen de esa actividad las panaderías y el curado de quesos. Como parásitos, los hongos enferman a plantas, hombres y animales, aunque la mayor parte de esos males son menos graves que los que les causan las bacterias y los virus. [24]

Son organismos eucariotes pluricelulares, carecen de clorofila, aerobios obligados y anaerobios facultativos, inmóviles, son quimiotróficos, secretores de enzimas que descomponen gran variedad de sustratos orgánicos para dar nutrientes solubles que después se absorben por la célula mediante transporte activo, cada célula fúngica posee al menos un núcleo, y membrana nuclear, retículo endoplásmico, mitocondria y aparato de golgi; además posee una pared celular rígida formada por capas de carbohidratos, cadenas largas de polisacáridos, glucoproteínas y lípidos; una membrana celular fúngica que contiene esteroides (ergosterol y cimosterol). No tienen clorofila. Sus cuerpos son usualmente alargados o filamentosos (5 a 10 μm de grosor y por lo general, ramificados).

Algunos hongos se ordenan en estructura de células múltiples llamados mohos y setas. El crecimiento en forma de moho produce colonias filamentosas multicelulares; las cuales crecen como túbulos cilíndricos ramificados llamados hifas, cuyo diámetro varía de 2-10 μm ; el conjunto de hifas enmarañadas forma el micelio, el cual a su vez puede ser aéreo que se encarga de la multiplicación del hongo y vegetativo, cuya función es de proporcionarle nutrientes al hongo y cumplir con sus actividades biológicas. En los hongos suelen distinguirse dos tipos de hifas, septadas de muchos hongos; tienen numerosos tabiques que separan las células individuales y las hifas aseptadas, tienen un tubo germinal sin tabiques con muchos núcleos.

La reproducción de los hongos se realiza por la formación de esporas sexuales o asexuadas. Las esporas asexuadas son las talosporas que se forman directamente en la hifa sin fusión nuclear; las conidias que nacen a partir de conidióforos y esterigma; y las esporangiósporas se forman dentro de estructura llamados esporangios.

Las esporas sexuadas se reproducen después de una fusión nuclear; tenemos las oosporas, resultado de la unión de dos gametogios; zigosporas, por la unión de dos hifas, Ascosporas se forman por la unión de dos células en un asca y basidiosporas se forma en una estructura que es basidio. Los hongos se clasifican de acuerdo a la reproducción sexual y de las esporas que resultan durante la fusión nuclear meiosis o intercambio de reproducción genética, las cuales se dividen en clases cigomicetos, ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos u hongos imperfectos. [25]

Fisiológicamente, los hongos se adaptan a condiciones más severas que los otros microorganismos. Se desarrollan en sustratos con concentraciones de azúcares que las bacterias no pueden tolerar, ya que los hongos no son tan sensibles a la presión osmótica elevada. Toleran y se desarrollan en concentraciones de acidez relativamente elevadas. Soportan escalas de pH entre 2 a 9, pero el pH óptimo es 5.6. Pueden sobrevivir en ambientes deshidratados que serían inhibidores para la mayor parte de las bacterias diferentes a las formadoras de esporas. Cuando el medio se deseca, los hongos producen esporas o pasan al estado de resistencia.

Casi todos los hongos son estrictamente aerobios, su crecimiento lo incrementa la presencia de abundante oxígeno; se desarrollan en condiciones de temperatura muy variadas, pero entre 22° a 30°C es la óptima para la mayoría. Algunos hongos pueden crecer a 0°C y por lo mismo, dañar la carne y los vegetales en refrigeración. Algunos hongos termófilos se desarrollan a 62°C. Las especies que producen esclerotia (cuerpos inactivos duros) son muy resistentes al calor. La glucosa es una fuente de carbono muy aprovechada por los hongos, también lo son la sacarosa y la maltosa. Obtienen el nitrógeno inorgánico de las sales de amonio o nitratos. El nitrógeno orgánico se proporciona a los medios de cultivo en forma de peptona. Para su desarrollo necesitan pequeñas cantidades de hierro, fósforo, potasio, zinc, cobre, manganeso y molibdeno. Algunas especies necesitan vitaminas. Las actividades bioquímicas de los hongos modifican la fertilidad del suelo, deterioran algunos materiales, y son decisivas en la maduración del queso, la producción de penicilina y la descomposición de alimentos.

Para estudiar los hongos se usan los mismos métodos generales de cultivo que para las bacterias. Casi todos se desarrollan en condiciones de aerobiosis en los medios de cultivo

bacteriológicos usuales, a temperaturas que varían entre 20° a 30°C. La mayor parte lo hacen más lentamente que las bacterias, y así, cuando llegan a coexistir, el desarrollo de éstas sobrepasa con creces el de los hongos.

Si se quiere aislar los hongos, resulta muy práctico usar un medio de cultivo que favorezca su desarrollo pero que no sea óptimo para las bacterias. Medios ácidos (pH 5.6) con concentraciones elevadas de azúcar son tolerados bien por los mohos pero inhiben a muchas bacterias.

Hay tres tipos generales de medios de cultivo para los hongos: medios naturales (con pedazos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales, etc.), medios de cultivo preparados con peptona, extractos de plantas, agra, etc., y medios sintéticos de composición variable. Los hongos crecen en medios de cultivos que contengan carbohidratos como agar dextrosa de Sabouraud, agar dextrosa-papa u otros; se observan colonias grandes con aspecto aterciopelado, pulvulentas, algodonosas y con pigmentación en los micelos aéreos y vegetativos. [24]

1.4.2.1.- *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* (Figura 1.8) 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.

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. [22]



Figura 1.8.- *Penicillium notatum*

1.4.2.2.- *Aspergillus Níger* y *Aspergillus fumigatus*

Se encuentran en la tierra, sobre la vegetación en descomposición, sobre el heno y la paja, en el polvo del aire acondicionado y en heces de pájaros. Se encuentran en todo el mundo. Son especies de hongos que por lo regular no causan enfermedades en seres humanos. En estos casos, la enfermedad solo se desarrolla en situaciones oportunistas, esto es cuando el paciente está debilitado por otras enfermedades o recibiendo antibióticos o cortisona para tratar alguna otra enfermedad. Estas micosis suelen ser consideradas no contagiosas. [26]

Tienen de 40 a 50 mm de diámetro. Tienen consistencia aterciopelada. De las más de 70 especies de *Aspergillus*, solo 4 causan enfermedades en el ser humano: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. terreus* (Figura 1.9). El hongo recibe el nombre de *Aspergillus* porque cada cuerpo de reproducción tiene la apariencia de un aspergilo, recipiente perforado que se utiliza para efectuar la aspersión de agua bendita. Las especies se identifican por el color y la apariencia burda de la masa micelia.

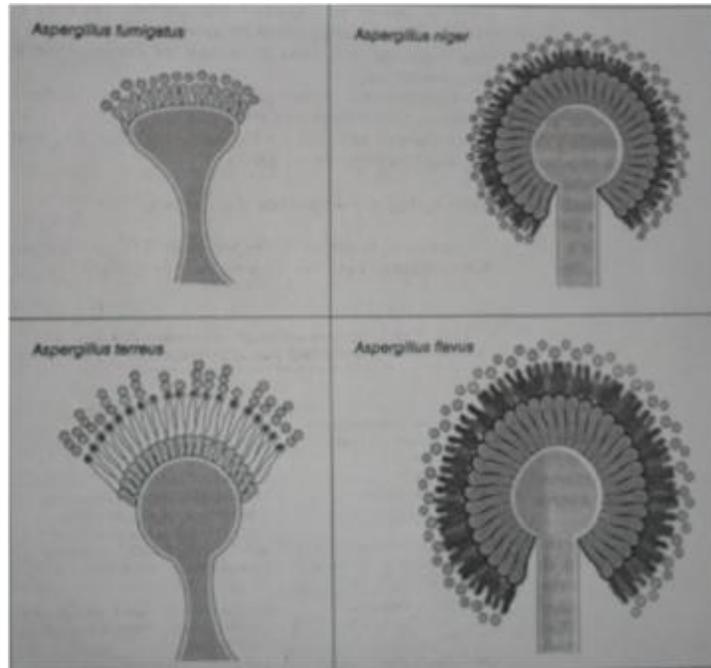


Figura 1.9.- Cuerpos reproductivos de *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. flavus*.

El hongo *Aspergillus fumigatus* (Figura 1.10) presenta un aspecto algodonoso. Produce cepas de color verde, verde amarronado o verde azulado con pliegues rugosos y presenta un delantal blanco en la periferia. Tiene esporas pigmentadas.

Causa micetomas cuando se inhala un gran número de conidias, ocasionando que se aloje en los pulmones y forme micelios en estas cavidades, casi nunca se observa en individuos saludables. Puede causar también aspergilosis alérgica, que ocasiona granulomas en los pulmones. Raramente causa enfermedades a los seres humanos. [27]



Figura 1.10.- *Aspergillus fumigatus*

El hongo *Aspergillus niger* (Figura 1.11) presenta un aspecto pulverulento y presenta esporas de color negro. El reverso de esta colonia presenta un color ámbar claro. Este hongo es utilizado en la producción de ácido glucónico, para producir gluconato de calcio (suplemento de calcio usado en niños y embarazadas). También se utiliza para producir ácido gálico, que se emplea en la elaboración de tintas y colorantes. Se utiliza en la producción de ácido cítrico, el cual se emplea en refrescos y otros alimentos, así como en preparaciones medicinales; así como en la preparación de ácido oxálico. [22]

Causa otitis externa (infección del canal de oído externo) que a menudo se acompaña de comezón, formación de escamas y dolor. Produce aspergilosis alérgica, la cual puede ser peligrosa y es una infección de tipo respiratorio. [27]



Figura 1.11.- *Aspergillus niger*

1.4.3.- Levaduras

Las levaduras se distinguen de los hongos porque su forma predominante es unicelular. Como células solas, crecen y se reproducen más aprisa que los hongos filamentosos y en proporción a su peso, son más aptas para efectuar cambios químicos porque tienen mayor área superficial en relación a su volumen.

Hay aproximadamente 350 especies de levadura. En comparación con otros grupos de microorganismos, las levaduras son pocas, ya que las algas, las bacterias y los protozoos suman varios miles de especies.

Las levaduras han servido al hombre durante siglos para fermentar jugos de frutas, pan o elaborar muchos y nutritivos alimentos. Su importancia es aún mayor ya que se utiliza en muchos procesos fermentativos y por sintetizar algunas vitaminas, grasas y proteínas a partir de azúcares simples y amoniacó.

El catabolismo de azúcares como la glucosa, es anaerobio (fermentación) o aerobio (respiración). El proceso más típico es el catabolismo anaeróbico, también más conocido como fermentación alcohólica. Los productos finales son alcohol etílico y dióxido de carbono. En la respiración, la oxidación completa de la glucosa produce dióxido de carbono y agua mientras que la oxidación incompleta da lugar a la acumulación de ácidos y otros productos intermediarios. [24]

En general, las células de las levaduras son más grandes que las de la mayor parte de las bacterias, pero las más pequeñas no son tan grandes. Las células de levaduras son esféricas, elípticas y cilíndricas (Figura 1.12). Su tamaño varía notablemente. La longitud de las células de algunas especies llega incluso a 100 micras. Se multiplican por gemación generalmente, aunque también puede reproducirse por fisión binaria y formación de esporas. No tienen flagelos u otros organelos de locomoción.

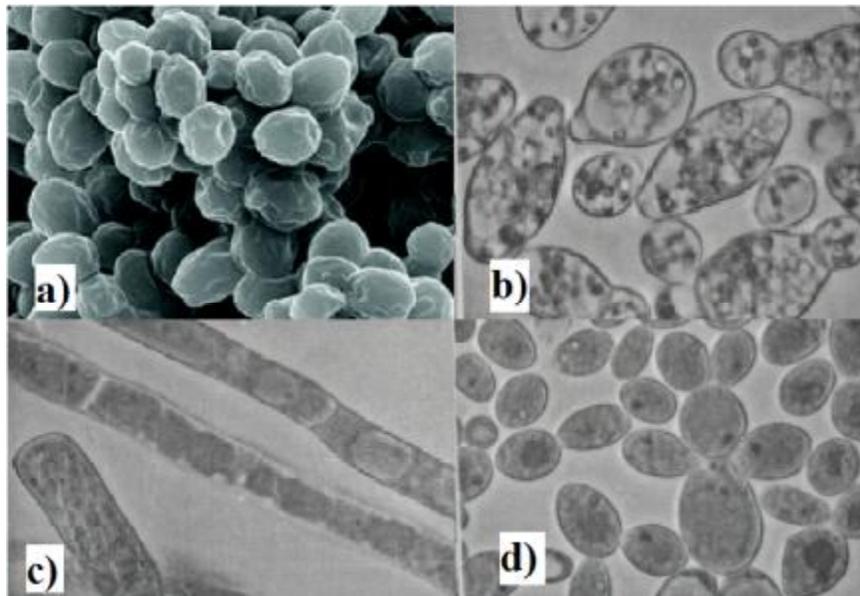


Figura 1.12.- Morfología de la levaduras. A) *Saccharomyces cerevisiae*, B) *Saccharomyces ludwigii*, C) *Geotrichum candidum* y D) *Pichia Membranaefaciens*.

Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos que otras formas de vida: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, magnesio, zinc, manganeso, cobre y molibdeno. Los últimos cinco metales se necesitan en cantidades ínfimas como componentes o activadores de enzimas. Suelen encontrarse en el agua o en medios de cultivos. El carbono se suele obtener de azúcares, ácidos orgánicos, aldehídos o glicerina. Parte del carbono se usa para la síntesis de constituyentes protoplásmicos, pero la porción mayor es oxidada con la producción de energía para procesos vitales. Se obtiene nitrógeno de productos de la hidrólisis de proteínas, como las peptonas o urea. El fósforo es esencial para el crecimiento y participa en el metabolismo de los carbohidratos.

Las levaduras presentan un crecimiento más activo cuando están en presencia de biotina, inositol, piridoxina, tiamina y niacina. Algunas especies crecen en medios que contienen 40 partes por 100 de agua. Crecen en límites amplios de pH, se multiplican en soluciones con acidez de 3 o alcalinidad de 7.5, aunque la reacción óptima se localiza entre 4.5 y 5.0 de pH. No hay crecimiento a temperaturas superiores a la de congelamiento, ni tampoco a temperaturas superiores a 47° C. La temperatura más adecuada se sitúa entre 20 y 30° C. Las levaduras mueren a temperaturas entre 52 a 58°C, a los 5 ó 10 minutos. Las esporas mueren a los 60° C en pocos minutos. La multiplicación de las levaduras es más rápida y mayor en condiciones aerobias que en anaerobias.

Prácticamente en cualquier tipo de terreno se encuentran las levaduras, y de esta fuente los insectos las diseminan ampliamente, son transportadas en partículas de polvo en el aire. Las esporas de levadura no tienen la misma resistencia que las de las bacterias y hongos, pero en desecación puede sobrevivir por años.

Las levaduras tienen predilección especial por alimentos ácidos que contengan azúcar, que pueda producir alcohol etílico y gran cantidad de gas. Las frutas son materiales que con frecuencia presentan este tipo de descomposición. Los insectos inoculan las frutas con levaduras. Dado que las levaduras pueden crecer sin oxígeno, el cierre hermético de recipientes o bolsas que contengan alimentos no impide este tipo de descomposición.

Algunas levaduras tienen importancia industrial, debido a su capacidad de producir alcohol etílico. También en la producción de glicerina, dulces, jarabes y pan. Otros tipos de

levaduras son patógenas y producen infecciones superficiales y profundas en el ser humano. [22]

1.4.3.1.- *Saccharomyces cerevisiae*

El género *Saccharomyces* abarca numerosas especies, tanto de levaduras cultivadas como salvajes. Según N. M. Stelling-Dekker, hasta 1951 se habían descrito 107 especies. Las especies de levaduras cultivadas abarcan razas diversas. Estas levaduras han sido cuidadosamente estudiadas debido a su gran importancia en la elaboración de vino, cerveza y pan, así como en industrias que dependen de un proceso fermentativo.

La relación de las levaduras y la fermentación fue descubierta en el siglo XIX, aunque la demostración completa de los poderes de fermentación de las levaduras se realizó hasta Pasteur, hacia el año 1865. Alrededor de 1880, el investigador danés Hansen estableció la práctica, hoy universal, de utilizar en las industria de fermentación cepas puras de levadura, cultivadas en laboratorio y seleccionadas especialmente por su eficacia para efectuar un determinado tipo de fermentación. [24]

Estas levaduras desprenden enzimas que son las que provocan en los azúcares los cambios químicos de la fermentación para formar alcohol y anhídrido carbónico. Ambos productos se encuentran en la cerveza, el mosto y la masa del pan. Los hoyos del pan se deben a las burbujas del CO₂. También la espuma de la cerveza y la efervescencia del champagne se deben al anhídrido carbónico formado por la levadura. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que presenta células alargadas, circulares a elipsoidales. Su coloración puede ser blanquecina o amarillenta (Figura 1.13). Presenta un olor característico. [28]



Figura 1.13.- *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae (“levadura de la cerveza”) es un hongo ambiental común y es un componente transitorio de las microbiotas digestiva y cutánea humanas. Se utiliza ampliamente en la elaboración de vino, cerveza, pan y otros alimentos.

Se han descrito casos de fungemia y endocarditis en pacientes con neoplasias (leucemias), receptores de trasplantes o inmunodeficientes y peritonitis en pacientes en diálisis ambulatoria crónica. *Saccharomyces cerevisiae* (como *Saccharomyces boulardii*) se ha empleado en el tratamiento de problemas gastrointestinales. [29]

1.5.- Antecedentes

Existen diversos trabajos en la literatura que demuestran las propiedades biocidas inherentes del quitosano en contra de un amplio rango de microorganismos tales como el filamentus fungi, levaduras y bacterias. [30]

Fernández Saiz y col. propusieron el quitosano como un biopolímero que presenta propiedades interesantes tales como excelente capacidad para formar películas y como una barrera de gas y aroma en condiciones secas que lo hace un material apropiado para el diseño de empaques de comida. Todas las propiedades mencionadas anteriormente hacen el quitosano un buen candidato para diseñar tecnologías de empaque antimicrobial activo para mejorar la calidad, seguridad y extender la vida en almacenamiento de alimentos perecederos. Por esa razón, el quitosano tiene mucho interés para su investigación y se pueden encontrar numerosos trabajos en la literatura en lo que respecta a su capacidad biocida. Los estudios anteriores han remarcado que varias características tales como el grado de acetilación, formación de película y condiciones de almacenaje, peso molecular o tipo y concentración del solvente orgánico empleado, determina la efectividad antibacterial del compuesto.

Además las bacterias en las diferentes etapas de crecimiento o una población microbiana inicial, también parecen ser factores cruciales en las pruebas de susceptibilidad, pero existe poca información con respecto a estos aspectos en particular. [31]

Rivero y col. determinaron, mediante el método de envenenamiento del medio de cultivo con agar dextrosa, la actividad antifúngica in vitro de diferentes concentraciones (300, 500, 700 y 1000 mg/L) del quitosano comercial Sigma, sobre el crecimiento micelial y la esporulación de los hongos fitopatógenos causantes del manchado del grano en arroz *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium verticillioides*, *Phoma sp.* Saccardo y *Sarocladium oryzae*. El quitosano mostró especificidad en su actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de los hongos, que fue máxima a la concentración de 1000 mg/L, excepto para *Phoma sp.* Se observó además acción fungicida del polímero sobre *A. padwickii* y *B. oryzae*, y fungistática sobre el resto de los hongos, con retraso del crecimiento sobre *F. verticillioides*. También se obtuvo reducción en la esporulación a medida que se incrementó la concentración de producto. Esto hace del quitosano Sigma una alternativa promisoriosa para el manejo de la enfermedad en el maíz. [32]

Tripathi y col. evaluaron la actividad antibacteriana de las películas de quitosano con nanopartículas de óxido de plata. La actividad de la película y de dos soluciones contra *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* fue medida por método de difusión de agar. Después de 24 horas de incubación a 37°C, la película mostró actividad antibacteriana efectiva en las bacterias grampositivas: *B. subtilis*, *S. aureus* y en las bacterias gramnegativas: *E. coli* y *P. aeruginosa*. Sus observaciones sugieren el uso del quitosano con nanopartículas de óxido de plata como biomaterial tiene una excelente habilidad antibacteriana para aplicaciones en empaque de alimentos. [33]

Stoicov y col. propusieron que el té verde es un agente efectivo contra las bacterias *H. feris* y *H. pylori*, una de las bacterias más comunes a nivel mundial, es un carcinógeno tipo 1 y el más importante factor de riesgo para cáncer de estómago el crecimiento bacteriano. En este estudio, se evaluó el efecto del té verde sobre las bacterias *H. felis* y *H. pylori* in vitro y durante el desarrollo de la gastritis inducida por *H. pylori* en un modelo animal. Los datos demostraron profundos efectos en el crecimiento de estas bacterias y lo más importante es que se demostró que puede prevenir la inflamación de la mucosa gástrica si se ingiere después de la exposición a una infección de este tipo. Las catequinas (componentes antioxidantes encontrados en el té verde) han mostrado inhibir y que presenta un efecto importante en el crecimiento de estas bacterias. [34]

Ferrazzano y col. demostraron que los polifenoles presentes en el café, chocolate y té (particularmente té verde y té negro) tienen un importante papel como inhibidores de la formación de placa dentobacterial y caries, debido a su acción antibacterial. Los estudios realizados al té verde y al té negro indican que los polifenoles del té ejercen un efecto anticaries mediante un modo de acción antibacterial, y que las catequinas muestran un incremento en sus actividades antibacteriales. El efecto anticaries contra el estreptococo α -haemolítico mostrados por los polifenoles sugiere realizar más estudios para una posible aplicación de estas bebidas en la prevención de la patogénesis de la caries dental. [35]

Peng y col. estudiaron los efectos de reducción de la resistencia a la meticilina (antibióticos β -lactama) de la bacteria estafilococo dorado mediante el uso de té verde. Este estudio ayudo a confirmar el efecto in vitro de los extractos de té verde y determinaron que puede reducir las concentraciones mínimas de inhibidor de amoxicilina en ratones infectados. Las catequinas fueron determinadas por cromatografía de líquidos. Las concentraciones mínimas de inhibidor de ampicilina, cefalozina, amoxicilina, oxacilina, extracto de té verde y extracto de té verde en combinación con antibióticos β -lactama fueron determinadas y administradas a grupos de ratones. Se demostró que las concentraciones mínimas de inhibidor de 4 antibióticos β -lactama fueron disminuidas de manera importante en presencia de 0.25% extracto de té verde. El té verde solo o con amoxicilina no mostró efecto alguno sobre los ratones infectados. [36]

Chakraborty y col. estudiaron la actividad antibacterial del extracto metanólico de las hojas de té verde en cuatro bacterias llamadas *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, así como en dos especies de hongos *Aspergillus*. La actividad antibacterial fue determinada por la medición de la zona de inhibición, así como de la concentración inhibitoria mínima de cuatro concentraciones de extracto metanólico (10, 25, 50 y 100 mg/mL) y eritromicina (10 mg/mL), la cual fue tomada como control antibiótico. Una proyección preliminar fue hecha para encontrar los componentes fitoquímicos presentes en el extracto. La cromatografía de capa delgada (TLC) fue desarrollada para separar y aislar los componentes bioactivos presentes en el extracto. Un fraccionamiento adicional del extracto metanólico con la ayuda de una columna cromatográfica fue desarrollada usando un gradiente paso a paso con cloroformo-metanol

contra la bacteria. La fracción que dió el mejor resultado fue tomada por el HPTLC para la identificación del componente el cual fue identificado como catequina. La zona de inhibición fue observada en la mayoría del organismo. El extracto alcohólico de las hojas de té verde fue más efectivo contra *Bacillus cereus*. [37]

McCarrell y col. demostraron que el extracto de la cáscara de granada presenta actividad contra las bacterias grampositivas a las 24 horas sin ningún efecto observable en cualquiera de las bacterias gramnegativas. Sin embargo, después de 12 h, zonas de inhibición se observaron sólo en *P. aeruginosa*. En contraste, agregando sales de Cu (II) a las soluciones de extracto de cáscara de granada extendió la actividad antibacterial resultando en una inhibición en el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*. Las actividades antimicrobianas fueron mínimas al utilizar sales de Fe (II), Mn (II) y Zn (II), solas o en combinación con el extracto de cáscara de granada contra estos microorganismos. La adición de vitamina C mejoró notablemente las actividades de las soluciones con Fe (II) y Cu (II) contra *S. aureus*. Todos los microorganismos fueron sensibles a las soluciones con vitamina C, con excepción de *B. subtilis*. [38]

Dahham y col. describieron las actividades antibacteriales y antifúngicas del extracto de cáscara de granada, extracto de semilla, jugo y fruta entera en bacterias y hongos selectos. El extracto de cáscara mostró la mayor actividad antimicrobiana. Entre las bacterias seleccionadas (*B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) la más alta actividad antibacterial fue registrada contra *Staphylococcus aureus* y entre los hongos seleccionados (*A. niger*, *P. citrinum*, *R. oryzae*, *T. reesei* y *M. indicus*) la mayor actividad antifúngica fue registrada contra *Aspergillus niger*. [39]

Steinberg y col. examinaron el efecto del jugo de arándano en varios constituyentes de la película dental, glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, así como sobre la adhesión de *Streptococcus sobrinus*. La actividad de glucosiltransferasa y fructosiltransferasa solubles e inmovilizadas fue inhibida por el jugo de arándano, el cual también inhibió la adhesión de *S. sobrinus* en hidroxiapatita (mineral formado por fosfato de calcio), lo que impide que el ácido láctico producido por la bacteria disuelva la hidroxiapatita y se deterioren los dientes.

Estos resultados indican que el jugo de arándano puede afectar la formación de película bacteriana. [40]

Johnson y col. demostraron que el jugo de arándano agregado a los medios de crecimiento para *E. coli*, para acidificar el medio, disminuye el crecimiento celular. Estos estudios demostraron que las azúcares o proantocianinas en el jugo de arándano son los responsables de la acidificación del medio. Sugirieron estudios para entender la actividad antimicrobiana de los componentes del jugo de arándano. [41]

En este proyecto se analizará la actividad biocida de las películas de quitosano-almidón adicionándole antioxidantes extraídos del té verde, té negro, betabel, arándano y granada en presencia de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras. Se espera que la adición de los antioxidantes mejore la capacidad antimicrobiana de las películas.

Capítulo 2.- Metodología experimental

En este capítulo se mencionan los diversos materiales y equipos que se utilizaron en el desarrollo del proyecto y el procedimiento de obtención de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales. Así como las pruebas antimicrobianas realizadas a las películas y las técnicas de caracterización aplicadas a las películas que presentaron resultados positivos ante la acción microbiana.

2.1.- Materiales

Para la síntesis de las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales se emplearon:

- Quitosano 85% deacetilado marca Sigma-Aldrich peso molecular medio
- Almidón de arroz marca Sigma, fórmula lineal: $(C_6H_{10}O_5)_n$
- Ácido acético glacial 100% marca Merck, fórmula: CH_3CO_2H , peso molecular: 60.05, densidad a 25 °C: 1.05 g/ml, inerte al ácido crómico
- Glicerol 99.7% grado reactivo marca Fermont, fórmula: $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$, peso molecular: 92.1, densidad a 25 °C: 1.27 g/ml
- Extractos de té verde, té negro, betabel, granada y jugo de arándano.

Para las pruebas microbiológicas se utilizó:

- Agar para método estándar marca Bioxon
- Agar dextrosa-papa para hongos y levaduras marca Bioxon
- Ácido tartárico peso molecular: 150.09 marca Mallinckradt Chemical
- Colonias de hongo *Penicillium notatum*
- Levadura de pan marca Tradipan
- Material de manejo

2.2.- Síntesis de películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales

Las soluciones quitosano (2%, p/v) se prepararon por dispersión. Dos gramos de quitosano en 100 ml de solución de ácido acético (1%, v/v) y con agitación constante durante 24 horas.

Una vez que el quitosano se disolvió completamente, las soluciones acuosas de almidón de 1,2 y 3% (p/v) se prepararon por calentamiento, a una temperatura más alta que la de su gelatinización ($90 \pm 2^\circ \text{C}$) durante 20 minutos bajo agitación constante. Las soluciones se enfriaron aproximadamente a 25°C bajo agitación.

Se prepararon películas quitosano-almidón, mezclando 40 ml de solución de quitosano al 2% con 40 ml de una solución de almidón (ya sea al 1.2 ó 3 %) con agitación constante. Se agregó glicerol al 0.25% (v/v) del total en solución. Se agregó el 0.5, 2 y 5% de té o jugo (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. [42]

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 esta se sintetiza en agua. En el caso del té verde y el té negro se usaron extractos acuosos al 3% (p/v) calentados a 65°C durante 5 minutos. Se filtraron y enfriaron a 25°C .

En el caso de la granada, se le extrajo el jugo. En el caso del betabel, se cortó y se dejó en agua destilada durante media hora para extraer los pigmentos. En el caso del arándano se utilizó jugo comercial de arándano que contiene azúcar y vitamina C.

2.4.- Prueba antimicrobiana

Una vez obtenidas las películas de quitosano-almidón-antioxidantes, se analizó la eficacia antimicrobiana del polímero elaborado, al cual se le aplicó el método de cultivo de vertido en placa, usando agar dextrosa-papa, y agar para método estándar.

Previamente, se esterilizó por vía seca el material de manejo como pipetas de 1, 2 y 5 ml y cajas petri en una estufa durante 2 horas a 150°C.

2.4.1.- Cultivo de hongos y levaduras

Para el cultivo de hongos y levaduras se utilizó agar dextrosa-papa. Por cada 100 ml de solución de agar se utilizaron 3.9 gr de agar en 100 ml de agua destilada, se sometió a calentamiento 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 el tubo para 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, para obtener un valor de pH= 3.5, aproximadamente.

Para el cultivo de estos microorganismos se tomaron muestras de:

- Colonia de hongos *Penicillium notatum*
- Levadura de pan marca Tradipan

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. De ésta dilución se agregó 1 ml 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.

En el caso de la muestra de levadura de pan, se pesó 1 gr de levadura de pan y se diluyó en 10 ml de agua. Se tomaron 0.1 ml de la muestra para cada caja petri y se cubrió con agar dextrosa-papa, se mezcló de la misma forma que la muestra anterior. Las muestras de

hongos se estudiaron a 25° C durante 4-5 días. Las muestras de levaduras se estudiaron por 2 días. [43]

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 gr de agar en 100 ml de agua destilada, se calentó y se dejó en ebullición por un minuto, bajo agitación constante. El agar y el tubo para dilución con 10 ml de agua destilada se esterilizaron 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 mezclaron de la misma forma que las anteriores. Se dejó solidificar. Las muestras de mesofílicos aerobios se estudiaron a temperatura ambiente durante 2 días, se observó la posible ausencia o inhibición del crecimiento de los diversos microorganismos. [44]

Las pruebas antimicrobianas se basaron en el método de discos utilizado en las pruebas de sensibilidad microbiana determinadas por la OMS. Se colocó un círculo del polímero quitosano-almidón-antioxidante en la caja de 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. [45]

Se caracterizaron las muestras tomadas de las películas de quitosano-almidón-antioxidantes que dieron resultados positivos después de la acción microbiana.

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 conocidos como: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), Análisis Mecánico Dinámico (DMA) y Análisis Termogravimétrico (TGA).

2.5.1.- Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja tiene aplicaciones en análisis cualitativo y cuantitativo. Su principal utilización es la identificación de compuestos orgánicos, debido a que no existen, teóricamente, dos compuestos que absorban exactamente en las mismas frecuencias IR. La espectroscopía infrarroja, como técnica cuantitativa, tiene su mayor aplicación en el análisis de contaminantes atmosféricos provenientes de los procesos industriales. Por lo que respecta al análisis cualitativo, la identificación de un compuesto se hace a partir del estudio sistemático del espectro correspondiente.

La espectroscopía infrarroja está más centrada en el estudio de compuestos orgánicos. Si no se aplica a los compuestos inorgánicos se debe a que la mayor parte de las vibraciones de estos compuestos están por debajo de la frecuencia de 400 cm^{-1} . [46]

Para la determinación de los grupos funcionales presentes en las películas de quitosano-almidón con antioxidantes naturales se utilizó un equipo de FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier) de la marca Perkin Elmer modelo Spectrum One.

El método utilizado fue el de Reflectancia Total Atenuada (ATR), con celda de seleniuro de zinc, modelo MIRACLE, con 12 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de 4000 a 600 cm^{-1} . El equipo se presenta en la Figura 2.1.



Figura 2.1.- Equipo FTIR Spectrum One marca Perkin Elmer.

2.5.2.- Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía es el estudio de la estructura fina y la morfología de objetos con el uso de un microscopio. El Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope), es aquel que utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen. Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación. Este instrumento permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. [47]

Para estudiar la morfología de las películas se utilizó un equipo SEM modelo JSM-6390 marca JEOL (Figura 2.2) a partir de electrones secundarios, con un voltaje de aceleración de 20 Kv a alto vacío y diferentes magnificaciones.

Debido a que las muestras no son conductoras de electricidad, éstas fueron recubiertas con un baño de oro en un equipo Electron Microscopy Science modelo EMS 550, a una presión

de vacío de 7×10^{-2} mB y 40 mA, en atmósfera de argón, haciendo un total de 4 baños con una duración de 5 minutos cada uno.



Figura 2.2.- Equipo SEM modelo JSM-6390 marca JEOL.

2.5.3.- 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 modulo 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.

La información de viscosidad en como el material fluye bajo tensión puede ser obtenido a partir de la viscosidad compleja. La relación del módulo de almacenamiento al módulo de pérdida es llamada damping o tangente delta y es calculada directamente a partir del ángulo fase delta. El damping es una medida de fricción interna del material e indica la cantidad de energía perdida en el material como calor disipado. Esto permite que el DMA sea utilizado para predecir qué tan bueno es un material en un damping vibracional o acústico.

Normalmente, los datos de DMA para sólidos son mostrados como módulo de almacenamiento y damping contra temperatura, con una multicurva usada para mostrar efectos de frecuencia. Los datos de fusión son a menudo mostrados contra frecuencia como datos clásicos de reología.

Dos aplicaciones son usadas: (1) frecuencia forzada, donde la señal es aplicada a una frecuencia fija y (2) resonancia libre, donde el material es perturbado y se le permite exhibir el decaimiento de la resonancia libre. Muchos DMA son del primer tipo. En ambas aplicaciones, la técnica es muy sensible a los movimientos de las cadenas poliméricas y es una poderosa herramienta para medir transiciones en los polímeros. Es 100 veces más sensible a la transición vítrea que a la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y resuelve otras transiciones más localizadas que no detecta el DSC. Además, la técnica permite el rápido barrido de los módulos de un material y la viscosidad como función de la temperatura o frecuencia. [48]

Para analizar las propiedades mecánicas en función de la temperatura, así como transiciones moleculares (T_g) y fenómenos de esfuerzo se utilizó un equipo DMA 2980 Dynamic Mechanical Analyzer marca TA Instruments en el modo de multifrecuencia utilizando una mordaza tipo Dual cantiléver, el cual se presenta en la Figura 2.3.

Se realizó una prueba de tensión en un intervalo de temperatura de 25 – 250°C, teniendo una velocidad de 5 °C/min y una frecuencia de 1 Hz y en la cual no se usó atmósfera de nitrógeno. El tamaño de las probetas fue de 0.5 x 3 cm



Figura 2.3.- Equipo DMA 2980 marca TA Instruments.

2.5.4.- Análisis Termogravimétrico (TGA)

La Termogravimetría o Análisis Termogravimétrico proporciona una medición cuantitativa de cualquier cambio de peso asociado a transiciones térmicamente inducidas. La TG puede registrar directamente la pérdida en peso como una función de la temperatura o del tiempo (cuando se opera en condiciones isotérmicas) para las transiciones que involucran deshidratación o descomposición.

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. Las velocidades de estos procesos térmicamente inducidos son frecuentemente una función de la estructura molecular.

El intervalo de temperatura usual para la TG es desde temperatura ambiente hasta 1200°C, tanto en atmósfera inerte como reactiva. En TG 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.

Son típicas las velocidades lineales de calentamiento desde 5 hasta 10° C/min. Los tamaños de muestra varían desde 1 a 300 mg. La TG ha sido usada en el análisis cinético de la estabilidad de los polímeros, análisis de la composición de materiales multicomponentes, análisis atmosféricos y estudios de corrosión, determinación de humedad y de volátiles, y en pruebas aceleradas de envejecimiento. El análisis térmico es afectado por las condiciones experimentales. [49]

Para observar la estabilidad térmica de las películas se usó un equipo DSC-TGA Simultáneo modelo SDT 2960 marca TA Instruments, el cual se presenta en la Figura 2.4. Las condiciones que se utilizaron son las siguientes: atmósfera de N₂ a 20 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 10 y 20 mg.



Figura 2.4.- Equipo DSC-TGA Simultáneo modelo SDT 2960 marca TA Instruments.

Capítulo 3.- Resultados y discusión

3.1.- Identificación y clasificación de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales.

Se desarrollaron 45 películas con solución de quitosano al 2%, solución de almidón al 1, 2 ó 3 % de almidón, 0.2 ml de glicerol y adicionando alguno de los extractos o jugos en una cantidad de 0.4, 1.6 y 4 ml. Asimismo, se formularon 3 películas con quitosano al 2% y solución de almidón (una por cada solución al 1, 2 y 3%) para ser utilizadas como referencia, obteniéndose un total de 48 películas. En la tabla 3.1 se presentan las claves con las que se identificaron para las diferentes pruebas.

Tabla 3.1.- Números y claves para identificar las películas durante la prueba antimicrobiana.

Número	Clave	Número	Clave	Número	Clave
1	A1TV0.5	17	A3TN2	33	A2B5
2	A1TV2	18	A3TN5	34	A3B0.5
3	A1TV5	19	A1G0.5	35	A3B2
4	A2TV0.5	20	A1G2	36	A3B5
5	A2TV2	21	A1G5	37	A1Ar0.5
6	A2TV5	22	A2G0.5	38	A1Ar2
7	A3TV0.5	23	A2G2	39	A1Ar5
8	A3TV2	24	A2G5	40	A2Ar0.5
9	A3TV5	25	A3G0.5	41	A2Ar2
10	A1TN0.5	26	A3G2	42	A2Ar5
11	A1TN2	27	A3G5	43	A3Ar0.5
12	A1TN5	28	A1B0.5	44	A3Ar2
13	A2TN0.5	29	A1B2	45	A3Ar5
14	A2TN2	30	A1B5	46	QA1
15	A2TN5	31	A2B0.5	47	QA2
16	A3TN0.5	32	A2B2	48	QA3

Donde Q= quitosano, A= almidón, TV= té verde, TN= té negro, G = granada B= betabel, Ar = jugo de arándano; el primer número representa la concentración del almidón usado y el segundo, el porcentaje en peso usado del extracto ó jugo utilizados.

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

Las películas quitosano-almidón (Figura 3.1) son transparentes, flexibles y tienen una coloración ligeramente amarilla. A medida que aumenta la concentración de la solución de almidón utilizada, se aprecia que las películas son menos rígidas.



Figura 3.1. – Aspecto de las películas quitosano-almidón.

Las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales (Figura 3.2) presentan coloraciones diversas y distintos niveles de transparencia. Las películas con té verde (a) tienen una coloración amarilla-verdosa, son transparentes y son menos flexibles que el resto de las películas. Las películas con té negro (b) presentan una coloración amarillo-café, son transparentes y son menos flexibles que las películas quitosano-almidón. La coloración de estas películas se puede atribuir a las catequinas.

Las películas con betabel (c) tienen una coloración ligeramente amarilla, son muy transparentes en comparación con el resto y son flexibles. En el caso de las películas con granada (d) y arándano (e), ambas presentan una coloración café-rojiza, son las más

flexibles y menos transparentes. La coloración de las películas se puede atribuir a las antocianinas presentes en estos alimentos. El espesor de todas las películas es de aproximadamente 2 mm.



Figura 3.2. - Aspecto de las películas quitosano-almidón con antioxidantes naturales:
a) té verde, b) té negro, c) betabel, e) granada, e) jugo de arándano.

3.3.- Prueba antimicrobiana

3.3.1.- Identificación de microorganismos

Los mesofílicos aerobios (Figura 3.3) constituyen un amplio grupo de microorganismos, que no pueden ser identificados por completo.



Figura 3.3- Aspecto de los mesofílicos aerobios.

Se identificaron las especies de hongos y levaduras 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*. [50]

La especie conocida como *P. notatum* (Figura 3.4) se identificó debido a su tamaño de 3 cm de diámetro aproximadamente, su coloración es verde-azulada y amarillenta. Tiene pliegues rugosos radiales.



Figura 3.4.- Aspecto de una colonia de *P. notatum*.

La especie conocida como *A. fumigatus* (Figura 3.5) se identificó debido a su tamaño de 3 cm de diámetro aproximadamente, aspecto aterciopelado, coloración verde-azulada y verde-amarronada. Presenta una coloración blanca en su periferia.



Figura 3.5.- Aspecto de una colonia de *A. fumigatus*.

La especie conocida como *A. niger* (Figura 3.6) se identificó debido a su tamaño entre 3 y 5 cm de diámetro, aspecto aterciopelado, color negro, el reverso de la colonia presenta un color café/ámbar.

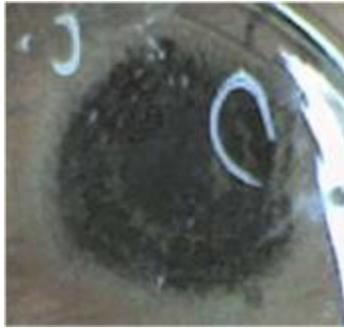


Figura 3.6.- Aspecto de una colonia de *A. niger*.

En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 3.7), se identificó debido a su olor característico, tamaño pequeño, formas circulares y de color amarillento. [29]



Figura 3.7.- Aspecto de colonias de *S. cerevisiae*.

3.3.2.- Observación de la actividad antimicrobiana.

Se realizaron pruebas antimicrobianas para comprobar la eficacia de las películas en presencia de hongos, levaduras y mesofílicos aerobios utilizando el método para hongos y levaduras y el método estándar para mesofílicos aerobios, los cuales fueron descritos en el capítulo 2. Los resultados obtenidos al finalizar el periodo de cultivo de los diversos microorganismos se muestran en las Figuras 3.9, 3.10, y 3.11, así como en la tabla 3.2.

Se define como alta actividad antimicrobiana, cuando la mayoría de las películas con cierto extracto no presentan crecimiento de algún microorganismo, si existe una inhibición en los alrededores. Se presenta una baja actividad cuando pocas o sólo una película presentan

actividad antimicrobiana. Una nula actividad antimicrobiana ocurre cuando se presenta crecimiento de algún microorganismo sobre las películas. (Figura 3.8).



Figura 3.8.- Zonas de crecimiento e inhibición de microorganismos en la caja petri.

En la figura 3.9, 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 (con granada), durante 2 días de incubación a temperatura ambiente. Se observó la actividad antimicrobiana de las películas sobre estos microorganismos, deduciendo que las que presentan una mayor eficacia contra los mesofílicos aerobios son las películas con granada, seguidas por las de betabel, té negro y arándano. Las películas con té verde presentaron una baja, sólo una película presentó actividad antimicrobiana. También presentó actividad la película quitosano con almidón al 2%.

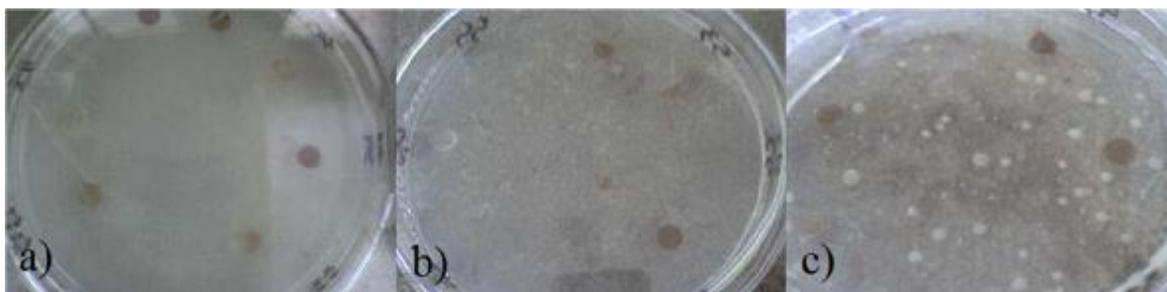


Figura 3.9. - Desarrollo de mesofílicos aerobios durante a) 0 h, b) 24 h y c) 48 h.

En la figura 3.10, 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 (con té verde), 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 observó la actividad antimicrobiana de las películas sobre estas 3 especies, deduciendo que las que presentan una mayor eficacia contra los hongos son las películas con betabel, seguidas por las de granada y té negro. También presentó actividad la película quitosano con almidón al 3%. Las películas con té verde y arándano no presentaron actividad contra estos hongos.

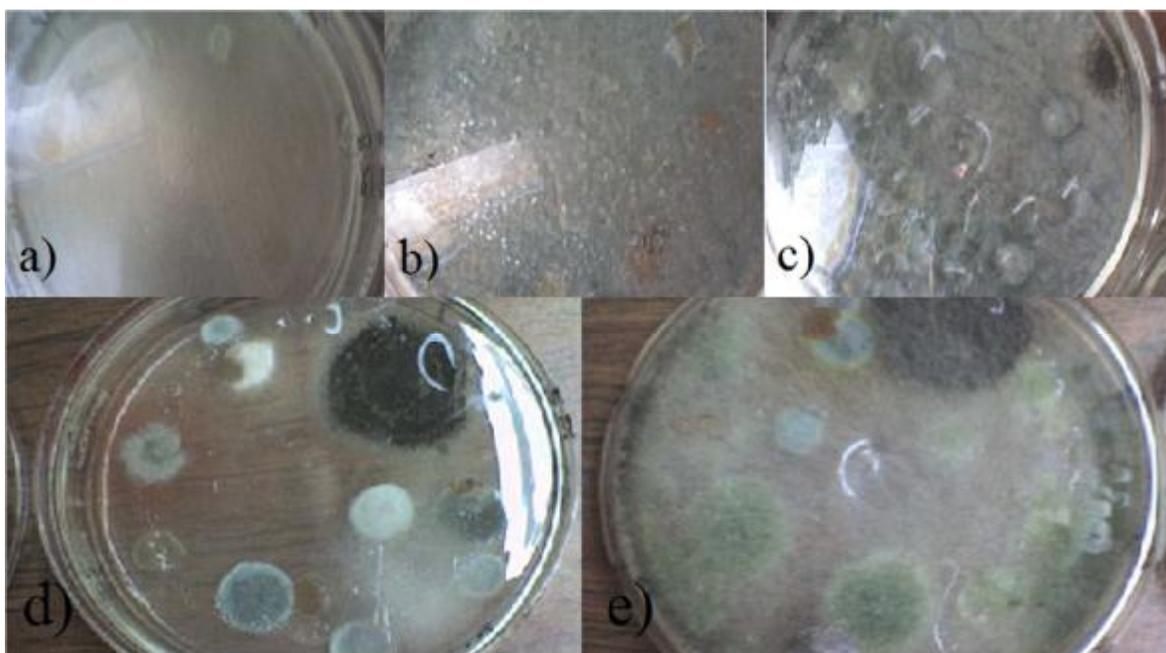


Figura 3.10. - Desarrollo de *P. notatum*, *A. fumigatus* y *A. niger* durante a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h, d) 96 h y e) 120 h.

En la figura 3.11, se muestra el crecimiento de colonias de *S. cerevisiae* sobre el agar dextrosa-papa, en cuya superficie se encuentran los discos de las películas de quitosano-almidón (con arándano), a lo largo de 2 días de incubación a 25°C. A partir del tercer día las cajas petri, presentaron crecimiento de *A. niger* y *A. fumigatus*, debido a que el medio de cultivo es ideal para el crecimiento de hongos y estas dos especies son los hongos de los más comunes en el ambiente. Se observó la actividad antimicrobiana de las películas sobre esta especie de levadura, deduciendo que las que presentan una mayor eficacia contra las levaduras son las películas con granada, seguidas por las de arándano. Las películas con té verde, té negro y betabel presentaron una baja (pocas películas con estos compuestos

inhibieron el crecimiento de levaduras) actividad antimicrobiana. También presentaron actividad la película quitosano con almidón al 2% y al 3%.



Figura 3.11. - Desarrollo de *S. cerevisiae* durante a) 0 h, b) 24 h y c) 48 h.

Tabla 3.2.- Películas que presentaron actividad antimicrobiana

Película	Extracto	Nomenclatura	Actividad antimicrobiana
3	Té verde	A1TV5	Mesofílicos aerobios, levaduras
10	Té negro	A1TN0.5	Mesofílicos aerobios, levaduras
15	Té negro	A2TN5	Mesofílicos aerobios
16	Té negro	A3TN0.5	Mesofílicos aerobios, hongos
17	Té negro	A3TN2	Hongos
19	Granada	A1G0.5	Mesofílicos aerobios
20	Granada	A1G2	Mesofílicos aerobios
21	Granada	A1G5	Mesofílicos aerobios
22	Granada	A2G0.5	Mesofílicos aerobios
23	Granada	A2G2	Mesofílicos aerobios
24	Granada	A2G5	Mesofílicos aerobios, hongos, levaduras
25	Granada	A3G0.5	Mesofílicos aerobios, hongos
26	Granada	A3G2	Mesofílicos aerobios, levaduras
27	Granada	A3G5	Mesofílicos aerobios, levaduras
29	Betabel	A1B2	Hongos
30	Betabel	A1B5	Hongos
31	Betabel	A2B0.5	Mesofílicos aerobios, hongos
32	Betabel	A2B2	Hongos
33	Betabel	A2B5	Hongos
34	Betabel	A3B0.5	Hongos
35	Betabel	A3B2	Mesofílicos aerobios, levaduras
36	Betabel	A3B5	Mesofílicos aerobios
37	Arándano	A1A0.5	Mesofílicos aerobios, levaduras
39	Arándano	A1Ar5	Mesofílicos aerobios
44	Arándano	A3Ar2	Levaduras
45	Arándano	A3Ar5	Levaduras
47	Quit-almidón	QA2	Mesofílicos aerobios, levaduras
48	Quit-almidón	QA3	Hongos , levaduras

De estas muestras se seleccionaron 20 para ser enviadas a caracterización por Análisis DMA, TGA, FTIR y SEM, además de las 3 muestras de películas quitosano-almidón: QA1, QA2 y QA3. Dando un total de 23 películas enviadas a las diversas caracterizaciones.

Se tomó en cuenta que en el caso de los mesofílicos aerobios sólo la película QA2 fue la única que presentó actividad contra todos los microorganismos, por lo que las películas quitosano-almidón con solución de almidón al 1 y 3% fueron caracterizadas.

En el caso de los hongos, sólo la película quitosano-almidón QA3 presentó actividad contra estos microorganismos, por lo que las muestras con antioxidantes naturales que fueron sintetizadas con solución de almidón al 1 y 2% fueron caracterizadas.

En el caso de las levaduras, las películas QA2 y QA3 presentaron actividad antimicrobiana, por lo que sólo las películas que contenían solución de almidón al 1% fueron caracterizadas. Se eligieron estas muestras porque se observó que la adición de antioxidantes naturales modificó las características biocidas de las muestras y era necesario conocer si debido a ello también se modificaban las características térmicas, morfológicas y mecánicas. Estas muestras se presentan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3- Muestras que se enviaron a diversas caracterizaciones.

Película	Extracto	Nomenclatura
3	Té verde	A1TV5
10	Té negro	A1TN0.5
16	Té negro	A3TN0.5
17	Té negro	A3TN2
19	Granada	A1G0.5
20	Granada	A1G2
21	Granada	A1G5
23	Granada	A2G2
24	Granada	A2G5
25	Granada	A3G0.5
26	Granada	A3G2
27	Granada	A3G5
29	Betabel	A1B2
30	Betabel	A1B5
31	Betabel	A2B0.5
32	Betabel	A2B2
33	Betabel	A2B5
35	Betabel	A3B2
36	Betabel	A3B5
37	Arándano	A1A0.5
39	Arándano	A1Ar5
46	Quitosano- almidón	QA1
47	Quitosano- almidón	QA2
48	Quitosano- almidón	QA3

3.4.- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En la figura 3.12 se muestran los espectros de las películas de quitosano – almidón QA1, QA2 y QA3. Se observa la banda a 3350 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos -OH del quitosano y el almidón; se determina que existen una gran cantidad de enlaces de puentes de hidrógeno debido a que la banda es ancha. Se presenta una banda a 3275 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo -NH , característico del quitosano. Alrededor de los 2920 y 2900 cm^{-1} se observan bandas debidas al estiramiento del grupo C-H. En 1640 cm^{-1} se observa la tensión del C=O y a 1570 cm^{-1} se presentan la deformación del grupo N-H de las aminas primarias, a 1300 cm^{-1} la tensión C-N. Se observa la banda del grupo piranósico (anillo que forman las hexosas, como la glucosa presente en el almidón y el quitosano) a 1077 cm^{-1} , y el estiramiento del grupo C-O-C a 1024 cm^{-1} . Entre 800 cm^{-1} y 600 cm^{-1} se presentan picos muy pequeños que pueden deberse a la presencia de los anillos aromáticos de los compuestos. El espectro de QA2 presenta una menor intensidad en sus bandas, en comparación de los espectros de QA1 y QA3, lo cual puede deberse a una particularidad de la muestra. [4] [51]

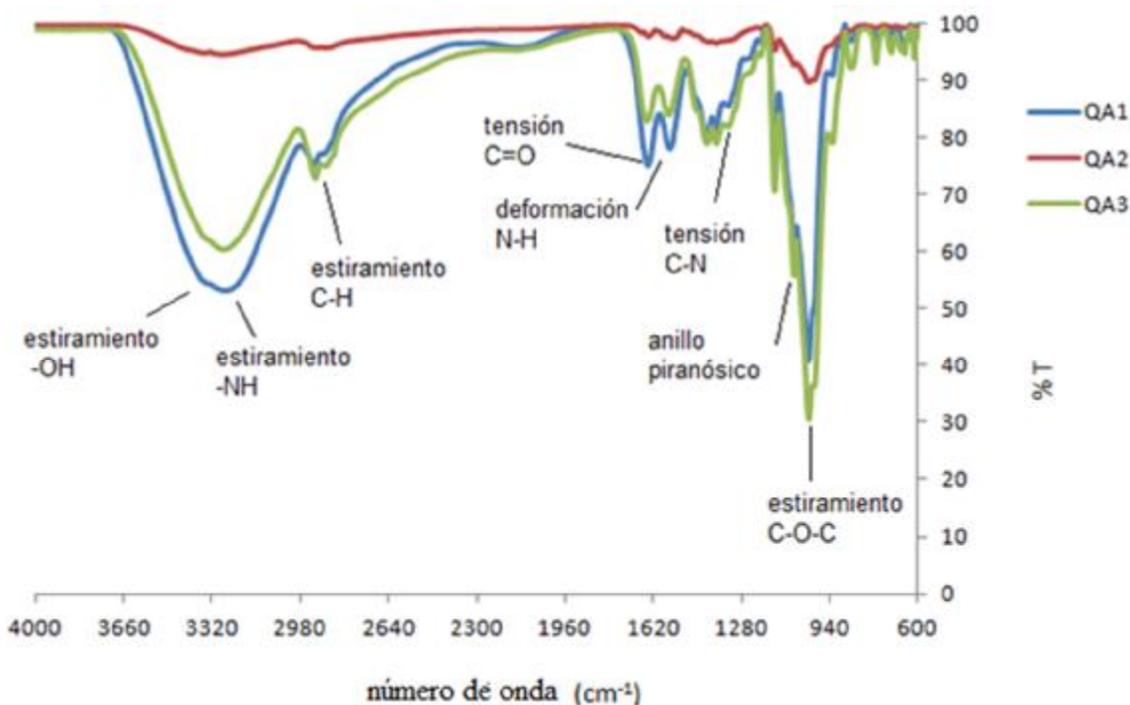


Figura 3.12.- Espectros de FTIR de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3.

En la figura 3.13 se muestra el espectro de la película de quitosano – almidón con extracto de té verde al 3%. Se observa la banda a 3410 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos $-\text{OH}$ del quitosano, el almidón y las catequinas; se determina que existen una gran cantidad de enlaces de puentes de hidrógeno debido a que la banda es ancha. Se presenta una banda a 3284 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo $-\text{NH}$, característico del quitosano. Alrededor de los 2924 cm^{-1} se observa la banda debida al estiramiento del grupo C-H, en 1646 cm^{-1} se observa la tensión C=O y en 1567 cm^{-1} se presentan la deformación del grupo N-H de las aminas primarias. Se observa la tensión C-N a los 1350 cm^{-1} , la banda del grupo piranósico (anillo que forman las hexosas, como la glucosa presente en el almidón y el quitosano) a 1076 cm^{-1} , y el estiramiento del grupo C-O-C a 1018 cm^{-1} . Entre 800 cm^{-1} y 600 cm^{-1} se presentan picos muy pequeños que pueden deberse a la presencia de los anillos aromáticos de las catequinas y del resto de los compuestos. Se observa un espectro muy parecido al obtenido en las películas quitosano-almidón.

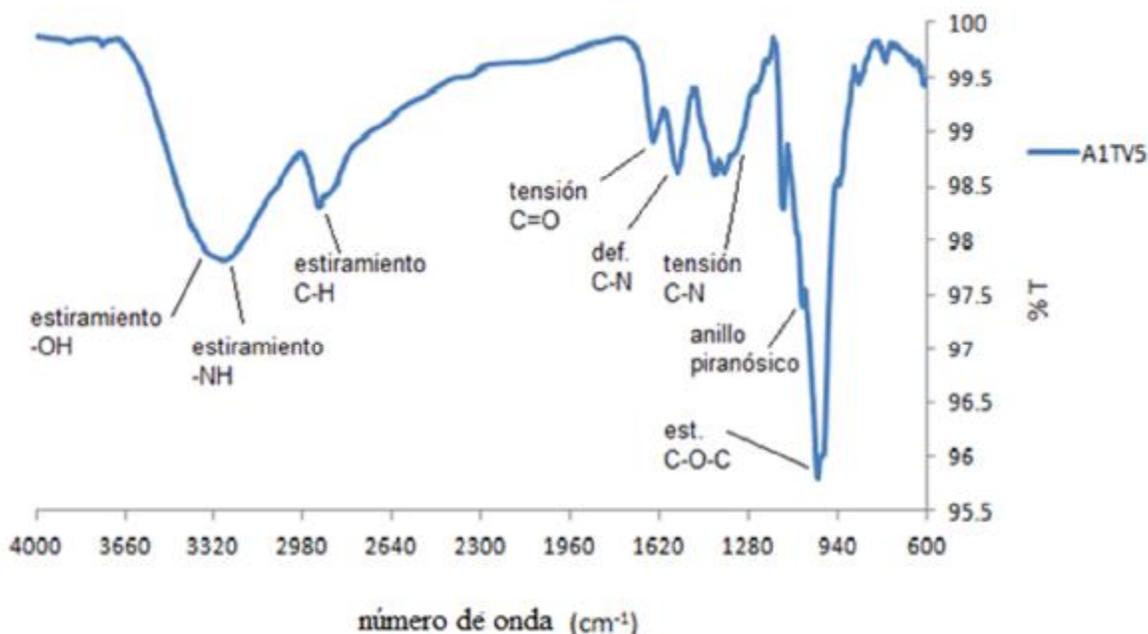


Figura 3.13.- Espectro de FTIR de la película quitosano-almidón con extracto de té verde al 3% A1TV5.

En la figura 3.14.- se muestran los espectros de las películas de quitosano – almidón con extracto de té negro al 3%. Se observa la banda a 3343 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos $-\text{OH}$ del quitosano, el almidón y las catequinas; se determina que existen una gran cantidad de enlaces de puentes de hidrógeno debido a que la banda es ancha. Se presenta una banda a 3268 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo $-\text{NH}$, característico del quitosano. Alrededor de los 2928 y 2878 cm^{-1} se observa la banda debida al estiramiento del grupo C-H , en 1661 cm^{-1} se presenta la tensión C=O y 1554 cm^{-1} se presentan la deformación del grupo N-H de las aminas primarias. Se observa a 1350 cm^{-1} la tensión C-N , la banda del grupo piranósico (anillo que forman las hexosas, como la glucosa presente en el almidón y el quitosano) a 1076 cm^{-1} , y el estiramiento del grupo C-O-C a 1018 cm^{-1} . Entre 800 cm^{-1} y 600 cm^{-1} se presentan picos muy pequeños que pueden deberse a la presencia de los anillos aromáticos de las catequinas y del resto de los compuestos. Presenta un espectro similar al de todas las películas de quitosano-almidón.

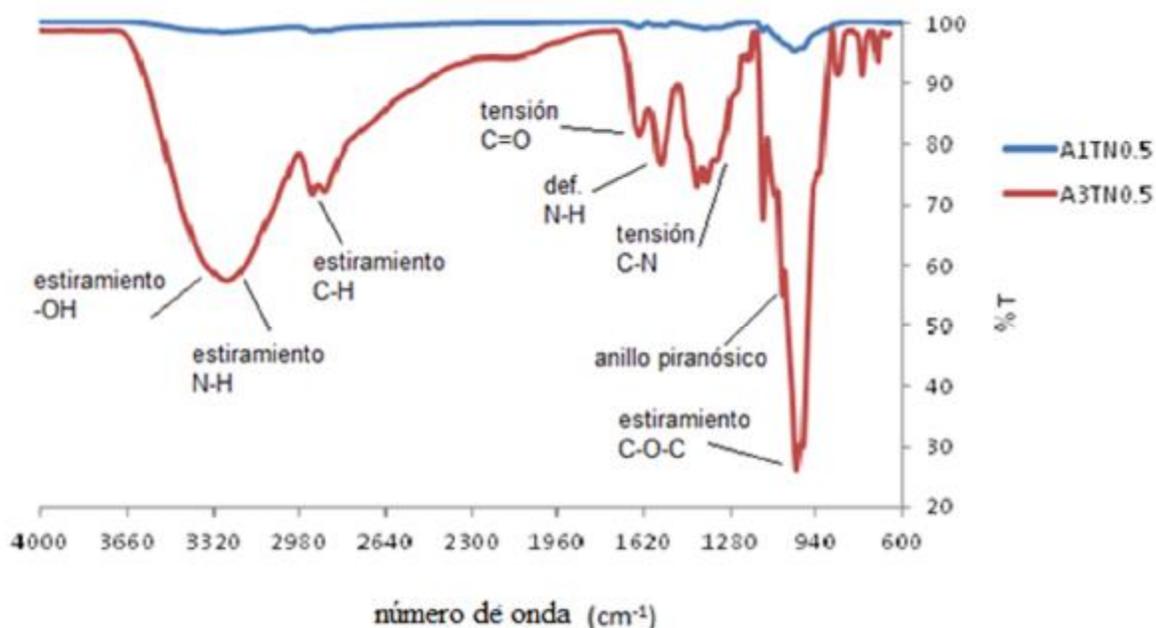


Figura 3.14.- Espectros de FTIR de las películas quitosano-almidón con extracto de té negro al 3% A1TN0.5 y A3TN0.5.

En la figura 3.15.- se muestran los espectros de las películas de quitosano – almidón con granada. Se observa la banda a 3335 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos –OH del quitosano, el almidón y las antocianinas; se determina que existen una gran cantidad de enlaces de puentes de hidrógeno debido a que la banda es ancha. Se presenta una banda a 3257 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo –NH, característico del quitosano. Alrededor de los 2946 y 2953 cm^{-1} se observan las bandas debidas al estiramiento del grupo C-H, en 1662 cm^{-1} la tensión de C=O y 1571 cm^{-1} se presentan la deformación del grupo N-H de las aminas primarias. A 1347 cm^{-1} se observa la tensión del grupo C-N, la banda del grupo piranósico (anillo que forman las hexosas, como la glucosa presente en el almidón y el quitosano) a 1083 cm^{-1} , y el estiramiento del grupo C-O-C a 1024 cm^{-1} . Entre 800 cm^{-1} y 600 cm^{-1} se presentan picos muy pequeños que pueden deberse a la presencia de los anillos aromáticos de las antocianinas y del resto de los compuestos. Presenta un espectro similar al de todas las películas quitosano-almidón. Los espectros de las películas con granada muestran diferencias en la intensidad de los picos, las cuales no parecen presentar relación con la cantidad de almidón o jugo de granada utilizados.

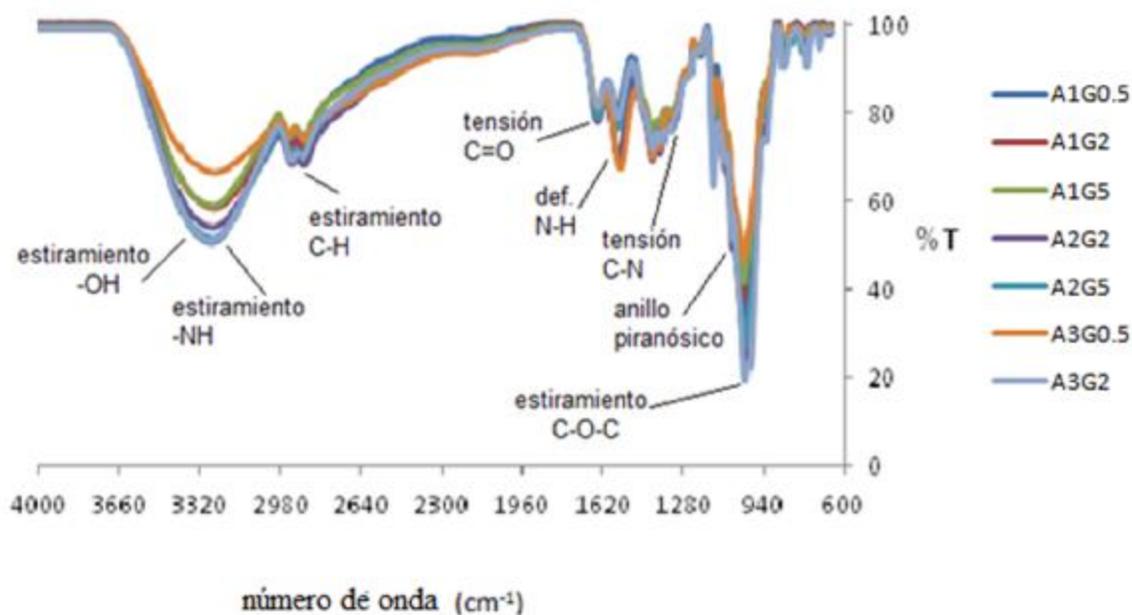


Figura 3.15.- Espectros de FTIR de las películas quitosano-almidón con granada A1G0.5, A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2.

En la figura 3.16 se muestran los espectros de las películas de quitosano–almidón con betabel. Se observa la banda a 3342 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos -OH del quitosano, el almidón y las antocianinas; se determina que existen una gran cantidad de enlaces de puentes de hidrógeno debido a que la banda es ancha. Se presenta una banda a 3270 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo -NH , característico del quitosano. Alrededor de los 2922 y 2901 cm^{-1} se observan las bandas debidas al estiramiento del grupo C-H , en 1647 cm^{-1} se observa la tensión de C=O y a 1567 cm^{-1} se presenta la deformación del grupo N-H de las aminas primarias. Se observa a 1320 cm^{-1} la tensión del grupo C-N , la banda del grupo piranósico (anillo que forman las hexosas, como la glucosa presente en el almidón y el quitosano) a 1059 cm^{-1} , y el estiramiento del grupo C-O-C a 1022 cm^{-1} . Entre 800 cm^{-1} y 600 cm^{-1} se presentan picos muy pequeños que pueden deberse a la presencia de los anillos aromáticos de las antocianinas y del resto de los compuestos. Los espectros son similares a los obtenidos en todas las películas quitosano-almidón. Los espectros de las películas con betabel muestran diferencias en la intensidad de los picos, las cuales parecen estar relacionadas con la cantidad de almidón utilizado, ya que a medida que aumenta la cantidad de almidón aumenta la intensidad del espectro.

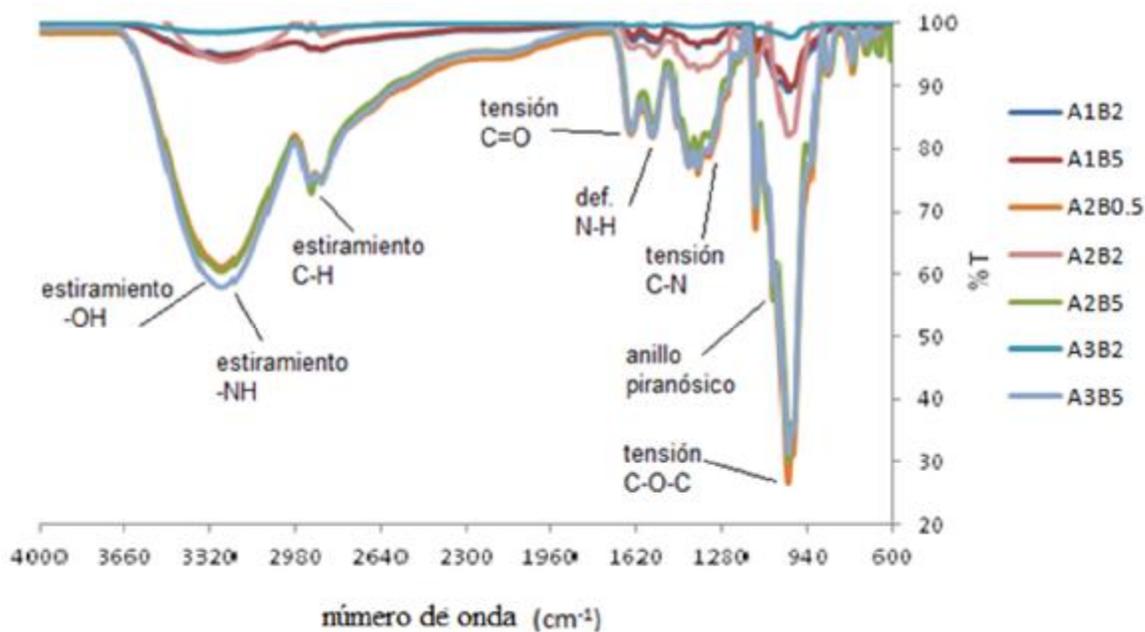


Figura 3.16.- Espectros de FTIR de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B0.5, A2B2, A2B5, A3B2 y A3B5.

En la figura 3.17 se muestran los espectros de las películas de quitosano – almidón con arándano. Se observa la banda a 3350 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos –OH del quitosano, el almidón y las antocianinas; se determina que existen una gran cantidad de enlaces de puentes de hidrógeno debido a que la banda es ancha. Se presenta una banda a 3277 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo –NH, característico del quitosano. Alrededor de los 2954 y 2904 cm^{-1} se observan las bandas debidas al estiramiento del grupo C-H, en 1646 cm^{-1} y 1565 cm^{-1} se presentan dos picos correspondientes a la deformación del grupo N-H de las aminas primarias. Se observa a 1374 cm^{-1} la tensión C-N, la banda del grupo piranósico (anillo que forman las hexosas, como la glucosa presente en el almidón y el quitosano) a 1086 cm^{-1} , y el estiramiento del grupo C-O-C a 1025 cm^{-1} . Entre 800 cm^{-1} y 600 cm^{-1} se presentan picos muy pequeños que pueden deberse a la presencia de los anillos aromáticos de las antocianinas y del resto de los compuestos. Los espectros son similares a los obtenidos en todas las películas quitosano-almidón. Los espectros de las películas con arándano muestran poca diferencia en la intensidad de los picos, lo cual parece estar relacionado con la cantidad de jugo de arándano utilizado.

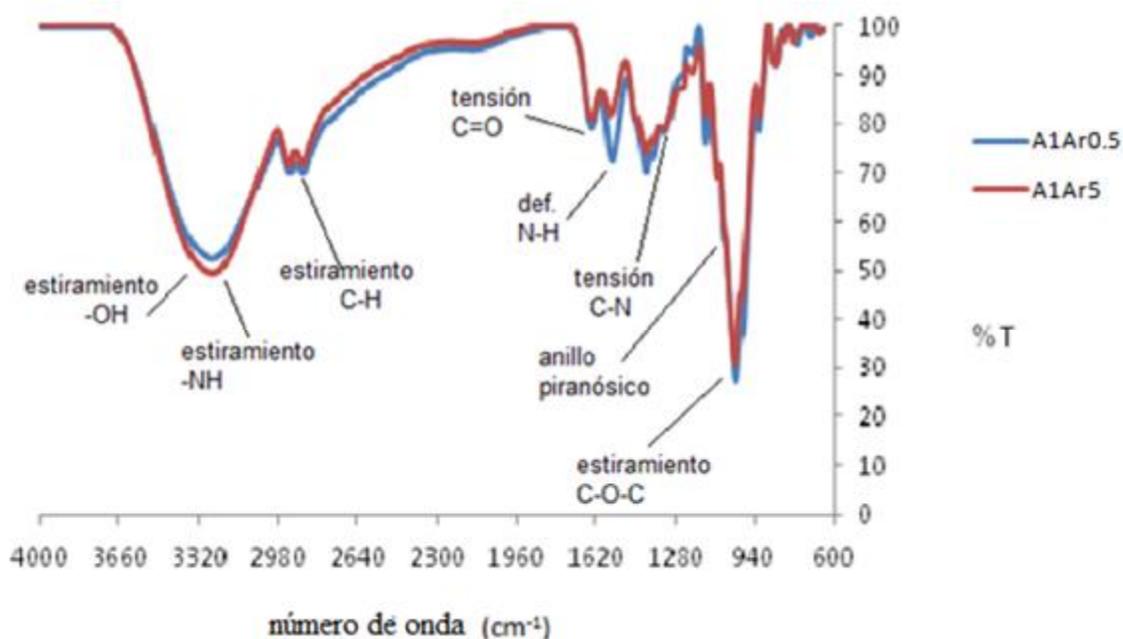


Figura 3.17.- Espectros de FTIR de las películas quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5 y A1Ar5.

3.5.- Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En los análisis de Microscopía Electrónica de Barrido se muestran diversas morfologías en las películas quitosano-almidón. En la Figura 3.18 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido sobre las película quitosano-almidón al 1% QA1. En la Figura 3.18 a) se observan múltiples formas ovaladas de tipo polidisperso con un diámetro de $6.5 \mu\text{m}$ en promedio y se observan algunos puntos blancos que son atribuidos a los gránulos de almidón. En la Figura 3.18 b) se observa una superficie de aspecto homogéneo con algunos gránulos de almidón y presencia de estrías o líneas acanaladas, estas líneas se asocian a la presencia del almidón. [52]

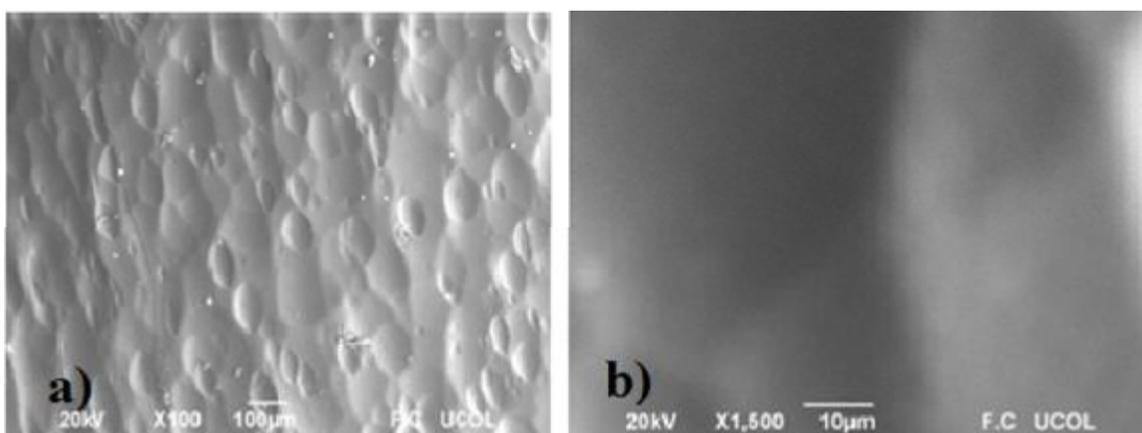


Figura 3.18.- Micrografías de la película quitosano-almidón al 1% QA1 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

En la Figura 3.19 se muestra la superficie de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5, amplificada a) 100 y b) 1500 veces. En la Figura 3.19 a) se observa una superficie de aspecto casi liso y de aspecto homogéneo, con pocos gránulos de almidón. En la Figura 3.19 b) se muestra una superficie donde se aprecian aglomerados de gránulos de forma redondeada de $0.5 \mu\text{m}$ de tipo polidisperso. Esta aglomeración podría deberse, por ejemplo, a una menor solubilidad de las moléculas de almidón, posiblemente causada por una menor variación en la temperatura al preparar la solución de almidón. Es decir, una modificación en el proceso de gelatinización del almidón [52]. Se observa también que la morfología de la película con té verde es diferente al compararla con la película quitosano-almidón.

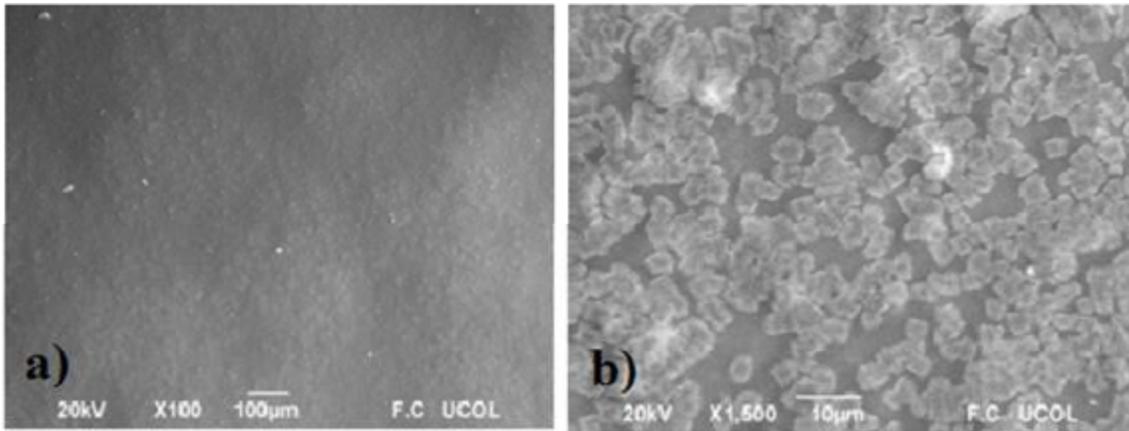


Figura 3.19.- Micrografías de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

En la Figura 3.20 se muestra la superficie de la película quitosano-almidón con té negro A1TN0.5, amplificada a) 100 y b) 1500 veces. En la Figura 3.20 a) se observa una morfología similar a “coles de Bruselas” con un diámetro de 20 μm en promedio una superficie de aspecto rugosa con estrías o líneas acanaladas, presenta y gránulos de almidón. En la Figura 3.20 b) se muestra una magnificación de la superficie donde se aprecian múltiples y profundas líneas acanaladas a través de la superficie del material y algunos gránulos de almidón.

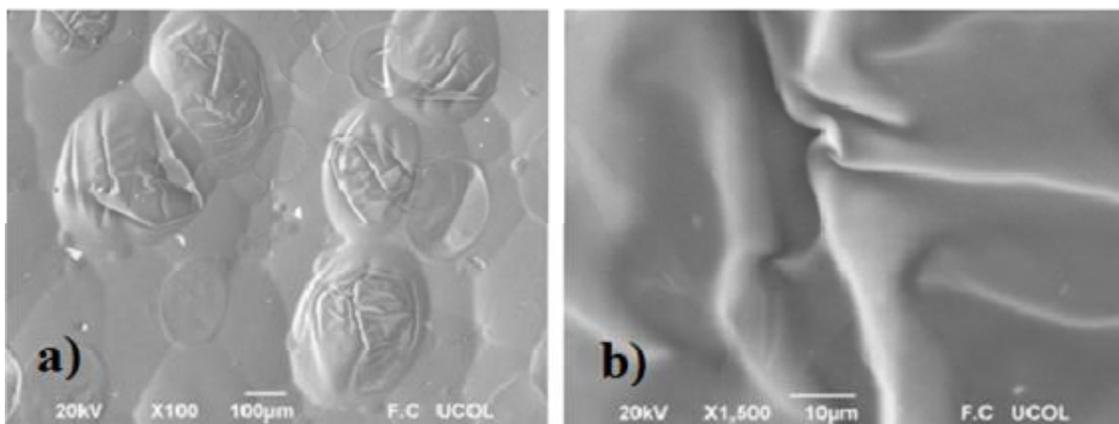


Figura 3.20.- Micrografías de la película quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

En las Figuras 3.21 y 3.22 se muestran las superficies de las películas quitosano-almidón con granada A1G2 y A1G5, amplificadas a) 100 y b) 1500 veces. En la Figura 3.21 a) se observa una superficie que presenta formas ovaladas de tipo monodisperso con un diámetro de 6.5 μm que le proporciona un aspecto rugoso con algunos gránulos de almidón. En la Figura 3.21 b) se muestra una superficie donde se aprecian estrías o líneas acanaladas y gránulos de almidón a través de la superficie del material. En la Figura 3.22 a) se observa una superficie rugosa con formas ovaladas de tipo monodisperso con un diámetro de 6.5 μm y pocos gránulos de almidón. En la Figura 3.22 b) se observa una forma ovalada con algunas estrías o líneas acanaladas profundas y una superficie rugosa.

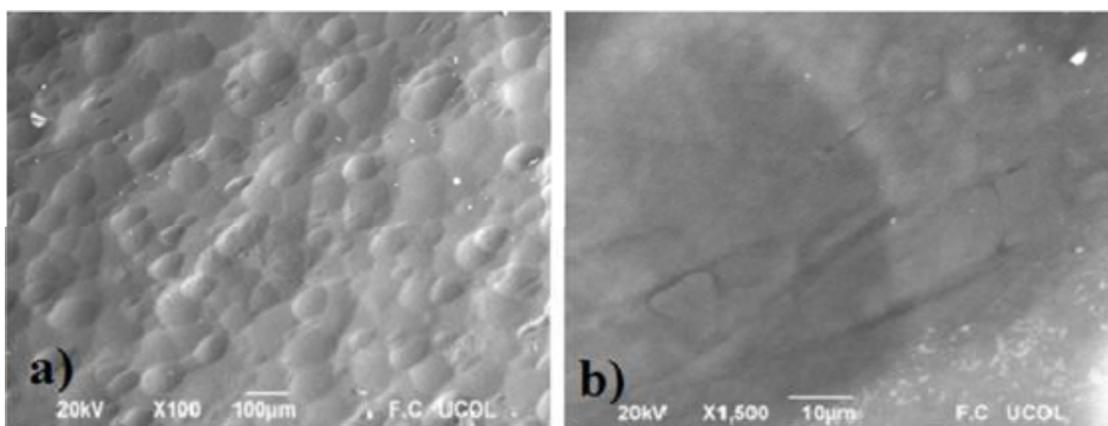


Figura 3.21.- Micrografías de la película quitosano-almidón con granada A1G2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

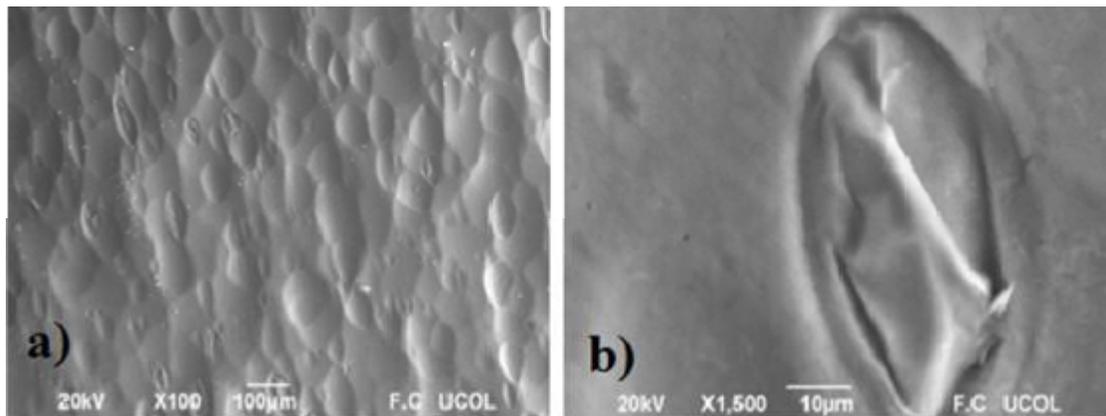


Figura 3.22.- Micrografías de la película quitosano-almidón con granada A1G5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

En las Figuras 3.23 y 3.24 se muestran las superficies de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2 y A1B5, amplificadas a) 100 y b) 1500 veces. En la Figura 3.23 a) se observa una superficie lisa con pocos gránulos de almidón. En la Figura 3.23 b) se muestra una superficie donde se aprecian pocos gránulos de almidón y la superficie poco rugosa del material. En la Figura 3.24 a) se observa una superficie rugosa que presenta formas similares a una “col de Bruselas” de tipo monodisperso con un diámetro de 18 μm con líneas acanaladas y algunos gránulos de almidón. En la Figura 3.24 b) se muestra una superficie donde se aprecian pocos gránulos de almidón y múltiples líneas acanaladas profundas en la superficie del material.

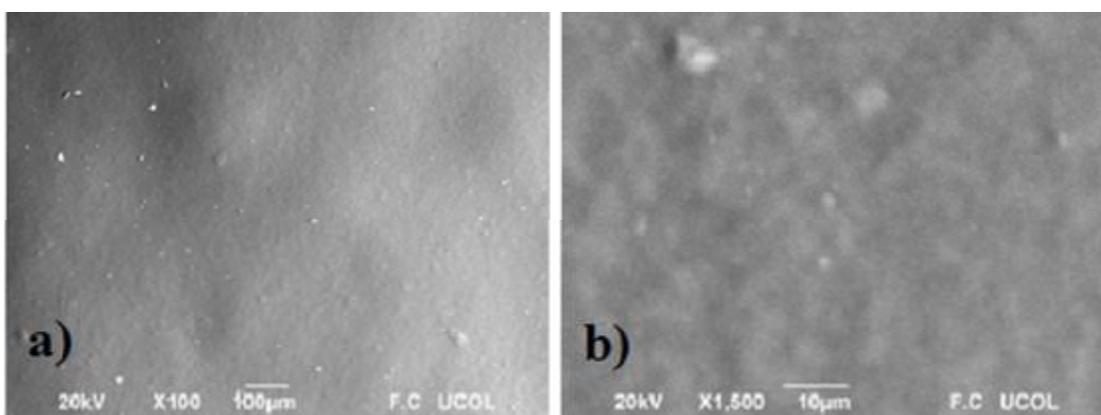


Figura 3.23.- Micrografías de la película quitosano-almidón con betabel A1B2 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

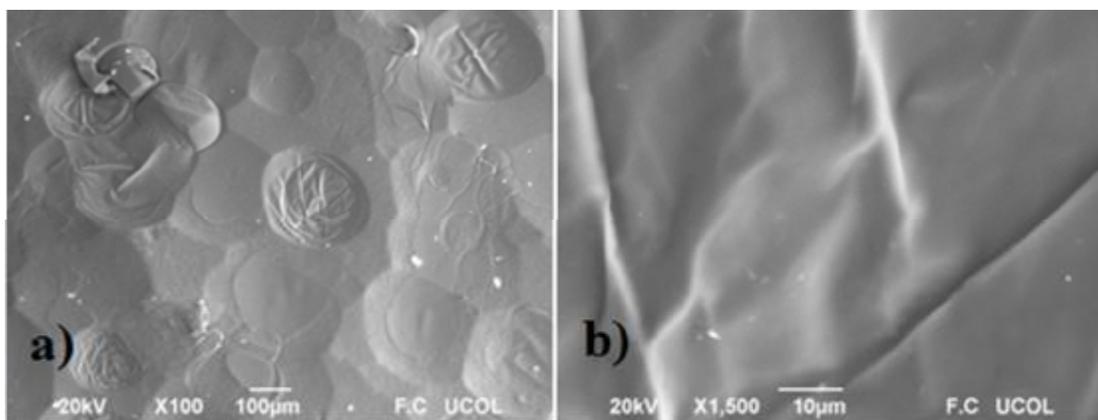


Figura 3.24.- Micrografías de la película quitosano-almidón con betabel A1B5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

En las Figuras 3.25 y 3.26 se muestran las superficies de las películas quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5 y A1Ar5, amplificadas a) 100 y b) 1500 veces. En las Figuras 3.25 a) y 3.26 a) se observan superficies poco rugosas que presentan diversas formas ovaladas de tipo monodisperso con un diámetro de 5 μm y con algunos gránulos de almidón. En las Figuras 3.25 b) y 3.26 b) se muestran magnificaciones donde se aprecian pocas líneas acanaladas profundas y gránulos de almidón a través de la superficie del material. Se observa un aspecto semejante al de las películas quitosano-almidón con granada.

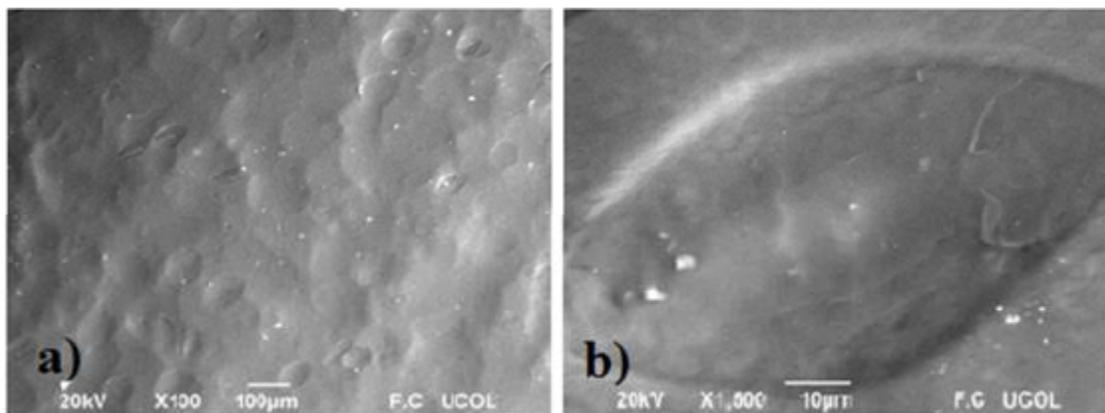


Figura 3.25.- Micrografías de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

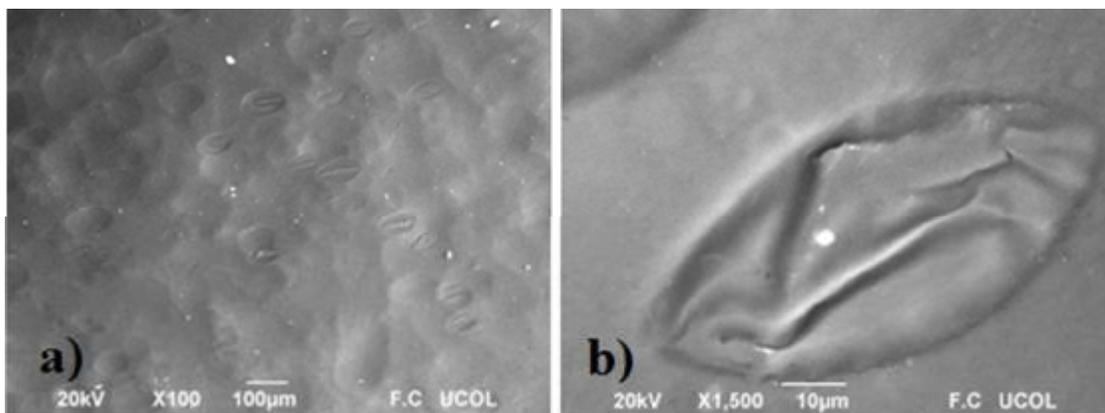


Figura 3.26.- Micrografías de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar5 a diferentes magnificaciones: a) 100 x b) 1.5 Kx.

Se concluye mediante la observación de las micrografías que la adición de extractos modifica la morfología de las películas quitosano-almidón.

3.6.- Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

En la Figura 3.27 se muestran las curvas de almacenamiento de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3. En cada curva se observan 3 regiones. La primera curva abarca desde la más baja temperatura hasta aproximadamente 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 realiza al aumentar la temperatura, esto va desde 90 hasta 140°C. En esta región el módulo de almacenamiento presenta un aumento y una posterior disminución en su valor debido a la presencia de almidón, el cual actúa como plastificante. La tercera región es conocida como viscoelástica y en ella la deformación a través del tiempo marca la temperatura de transición vítrea o Tg, esta región se ubica entre 140 hasta 200°C. Se observa un ligerísimo aumento en el módulo de almacenamiento en la región posterior a la Tg (180-200) debido a la rápida alineación de las cadenas poliméricas bajo la tensión aplicada. Se observa también que conforme aumenta la cantidad de almidón los valores de E' disminuyen. A medida que los valores de E' son menores la película es menos rígida. [53]

A una temperatura de 35 °C la película QA1 presenta un E' de 484 MPa, la película QA2 presenta un E' de 501 MPa, la película QA3 presenta un E' de 262 MPa.

En la tabla 3.4 se muestran los valores de E' para todas las muestras a los 35, 100, 150 y 180 °C. Se observa un aumento en los valores de E' alrededor de los 75-100 °C debido a la presencia de almidón, el cual actúa como un plastificante. Se observa que los valores aumentan al disminuir la cantidad de almidón. (Tabla 3.4)

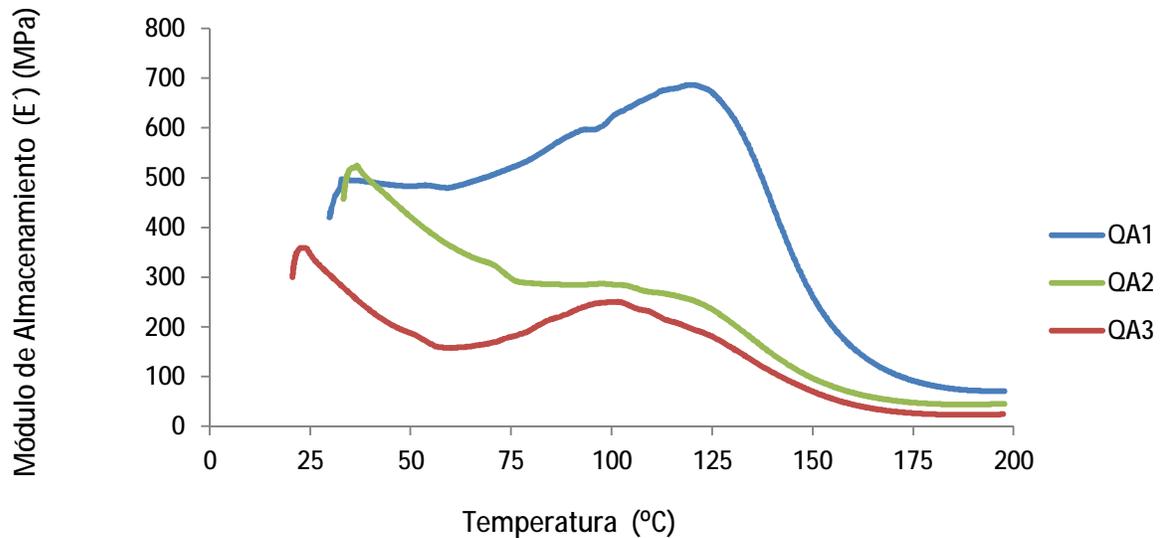


Figura 3.27. - Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3.

En la Figura 3.28 se muestra la curva $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3. La muestra con mayor cantidad de almidón presenta una menor temperatura de transición en comparación con las otras muestras. En algunos estudios se ha determinado que los valores de T_g disminuyen al aumentar la cantidad de plastificante. El efecto del plastificante determina el valor de T_g . La temperatura de transición vítrea (T_g) del quitosano puro es de 203 °C. [54]

En las tres curvas se observa un comportamiento similar. Se observa un ligero aumento de $\tan \delta$ alrededor de los 55 a 95°C y se observa otro aumento antes de alcanzar la T_g . Este comportamiento se relaciona con la presencia del ácido acético con el que se preparó la disolución de quitosano para sintetizar las películas. Posteriormente existe una disminución asociada a la desorción de agua. La transición ocurrida en la T_g se relaciona con los enlaces de hidrógeno presentes en la muestra. [55]

La mayor temperatura de transición la presenta la muestra QA2 la cual es de 156 °C, para la muestra QA1 es de 148°C, y para la muestra QA3 es de 146 °C. (Tabla 3.5)

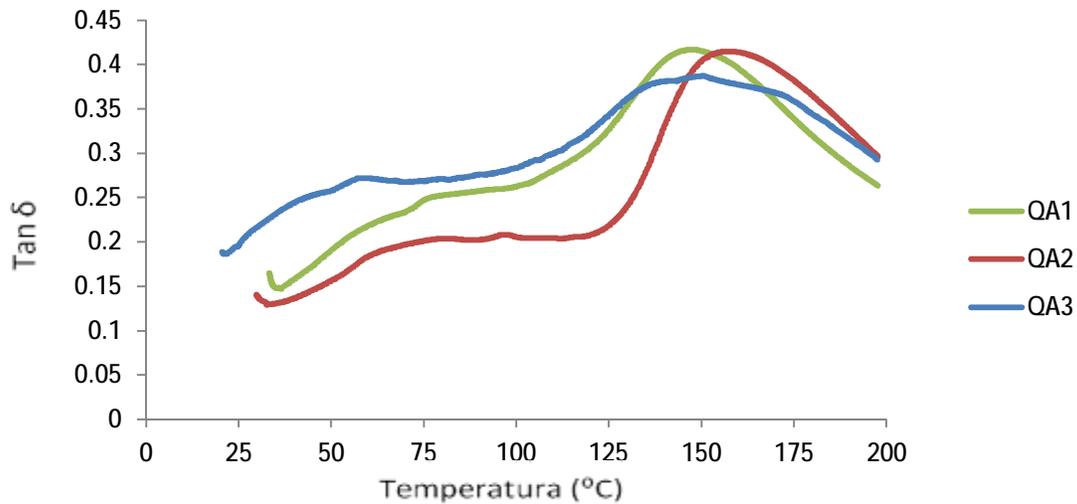


Figura 3.28.- Curva de $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3.

En la Figura 3.29 se muestra la curva de almacenamiento de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5. Las regiones que presenta la curva de E' corresponden a las mismas observadas en las películas quitosano-almidón. Sin embargo, se nota una curva más pronunciada que empieza en un valor de E' de 65 MPa a 35 °C y que alcanza su máximo a 125 °C, coincidiendo con el comportamiento observado en la película QA1. No obstante, se presenta un cambio al final de la curva de A1TV5 en comparación con QA1 debido a que existen cambios estructurales causados por el método de síntesis. (Tabla 3.4)

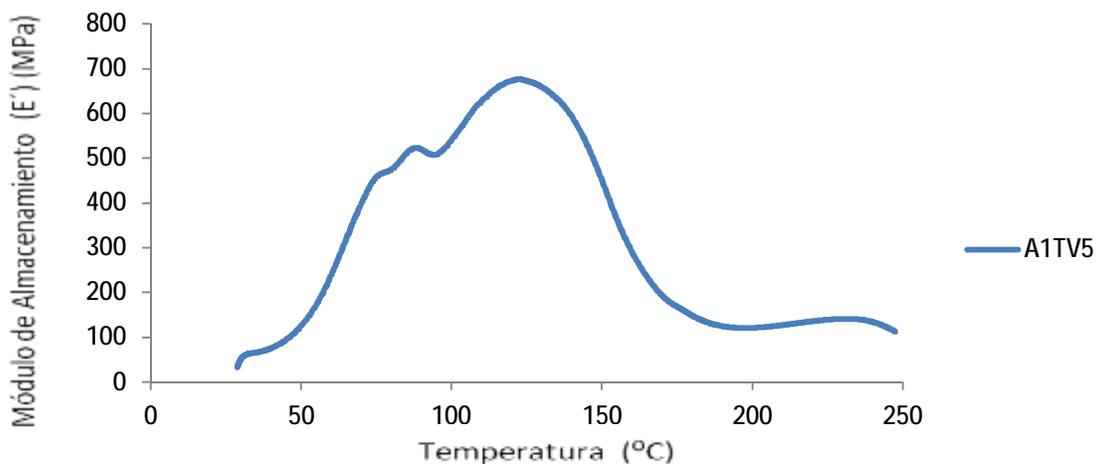


Figura 3.29.- Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con té verde A1TV5.

En la Figura 3.30 se muestra la curva de $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5. Se observa un ligero aumento de $\tan \delta$ alrededor de los 100°C y se observa otro aumento antes de alcanzar la T_g . Este comportamiento se relaciona con la presencia del ácido acético con el que se preparó la disolución de quitosano para sintetizar las películas. La transición ocurrida en la T_g se relaciona con los enlaces de hidrógeno presentes en la muestra.

La muestra presenta una mayor temperatura de transición en comparación con las muestras de películas quitosano-almidón, las cuales tienen valores de T_g que van desde 146 °C hasta 156 °C. La temperatura de transición que presenta es de 175 °C. Se observa un aumento de la T_g en comparación con QA1 (148 °C). Estos cambios se deben a la adición de té verde a las películas quitosano-almidón. (Tabla 3.5)

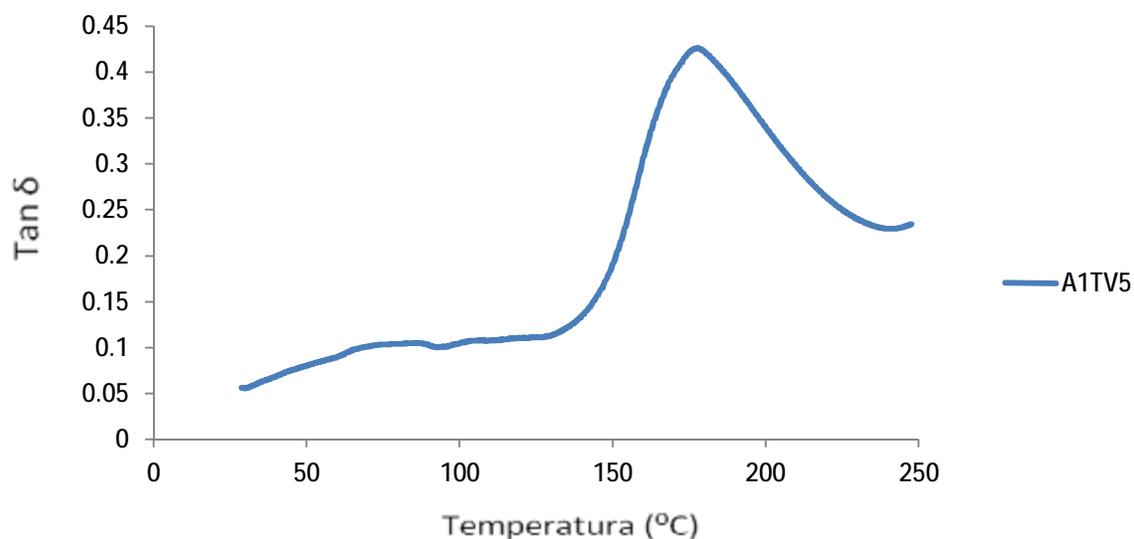


Figura 3.30.- Curva de $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón con té verde A1TV5.

En la Figura 3.31 se muestra las curvas de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 y A3TN0.5. Las regiones que presentan las curvas de las películas con té negro son similares a las obtenidas en las películas quitosano-almidón. Se observa una curva más pronunciada en el caso de A1TN0.5

En el caso de A1TN0.5 el valor de E' es de 2190 MPa a 35 °C. En el caso de A3TN0.5 el valor de E' es 220 MPa a 35 °C. Ambas curvas alcanza su máximo valor a los 125 °C igual que en el caso de las películas quitosano-almidón. El comportamiento de las curvas del A1TN0.5 y A3TN0.5 puede indicar cambios estructurales debido al método de síntesis.

Los valores de E' son mayores en la muestra de A1TN0.5. Este comportamiento no sigue el observado en las muestras quitosano-almidón. Sin embargo, se observa que para A1TN0.5 el valor de E' es mayor en comparación con QA1, en el caso de A3TN0.5 el valor de E' es menor en comparación con QA3. (Tabla 3.4)

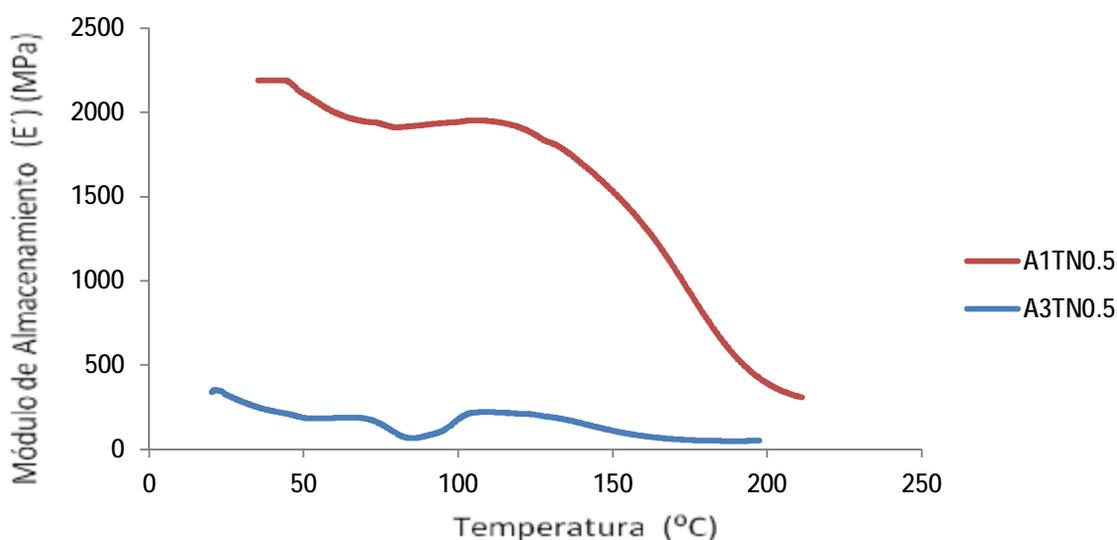


Figura 3.31.- Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 y A3TN0.5.

En la Figura 3.32 se muestra las curvas de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón con té verde A1TN0.5 y A3TN0.5. En la curva de A1TN0.5 se observa un comportamiento similar al de las películas quitosano-almidón y A1TV5. La curva de A3TN0.5 presenta un comportamiento diferente, esto puede deberse a cambios estructurales en la muestra.

La temperatura de transición que presenta la muestra A1TN0.5 es de 192 °C, para la muestra A3TN0.5 es de 91 °C. Se observa que la T_g en A1TN0.5 aumenta en comparación

con QA1. La muestra con mayor cantidad de almidón presenta una menor temperatura de transición igual que en las películas quitosano-almidón. (Tabla 3.5)

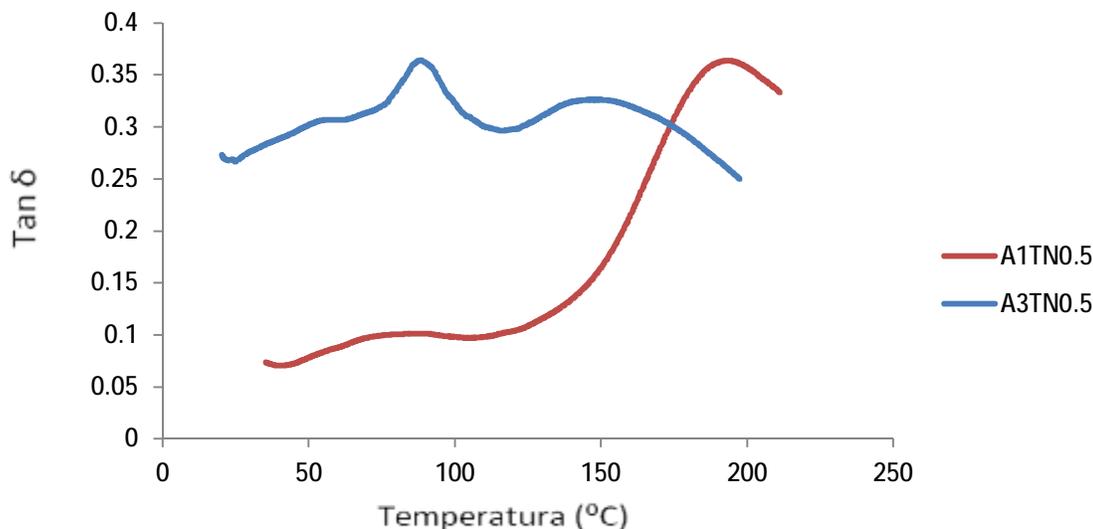


Figura 3.32.- Curva de tan δ de la película quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 y A3TN0.5.

En la Figura 3.33 se muestra las curvas de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con granada A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2. Las regiones que presentan las curvas de E' de las películas con granada corresponden a las mismas que las muestras de las películas de quitosano-almidón.

Los valores de E' a 35 °C son de 27 MPa para A1G2, 56 MPa para A1G5, 164 MPa para A2G2, 75 MPa para A2G5, 258 MPa para A3G0.5 y 173 MPa para A3G2. Las películas muestran sus valores máximos de E' alrededor de los 125-150 °C (Tabla 3.4).

El valor de E' disminuye para A1G2 en comparación con QA1, disminuye para A1G5 en comparación con QA1, aumenta para A2G2 en comparación con QA2, disminuye para A2G5 en comparación con QA2, aumenta para A3G0.5 en comparación con QA3 y aumenta para A3G2 en comparación con QA3. (Tabla 3.4)

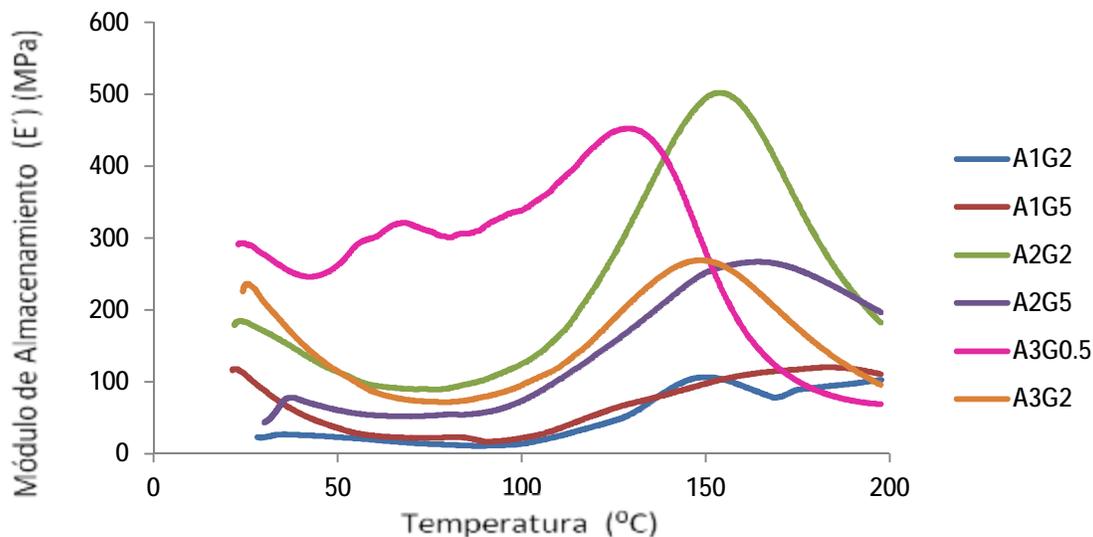


Figura 3.33.- Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con granada A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2.

En la Figura 3.34 se muestran las curvas de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón con granada A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2. Se observa en las curvas de E' un ligero aumento de $\tan \delta$ alrededor de los 90-100 °C y se observa otro aumento antes de alcanzar la T_g . Las temperaturas de transición para las películas son de 87 °C para A1G2, de 173 °C para A1G5, de 188 °C para A2G2, se observa ligeramente una T_g de 100 °C para A2G5, 161 °C para A3G0.5 y de 111 °C para A3G2.

Algunas de las muestras con mayor cantidad de almidón presentan una menor temperatura de transición en comparación con muestras con menor cantidad de almidón. Se observa también que algunas de las T_g aumentaron en comparación con QA1, QA2 y QA3. No se observa una relación en el aumento de T_g con respecto al aumento de la cantidad de extracto o jugo añadido. (Tabla 3.5)

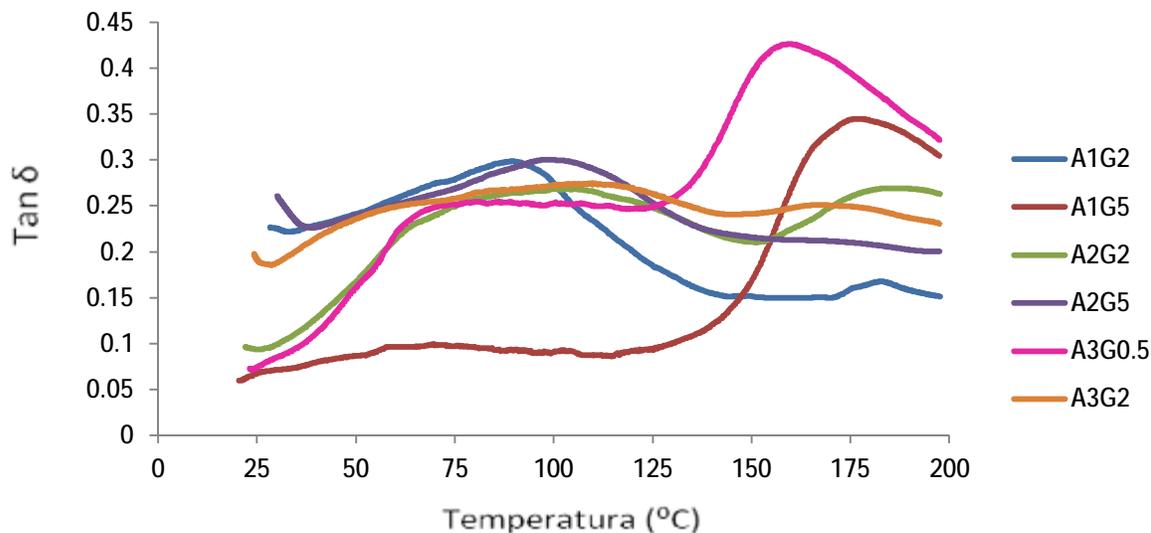


Figura 3.34.- Curvas de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón con granada A1G2, A1G5, A2G2, A2G5, A3G0.5 y A3G2.

En la Figura 3.35 se observan las curvas de módulo de almacenamiento para las muestras de quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B0.5, A2B2, A2B5, A3B2 y A3B5. Las regiones de las curvas de E' de las películas quitosano-almidón sintetizadas con betabel corresponden a las que muestran las películas de quitosano-almidón. Sin embargo se observa que en ninguna muestra existe un aumento en el módulo de almacenamiento en la región posterior a la T_g . En estas películas no se observa que conforme aumente la cantidad de almidón los valores de E' disminuyen. El comportamiento de estas muestras es un poco diferente, las películas con almidón al 1% presentan los valores menores de E' .

A la temperatura de 35°C se presentan valores de E' de de 577 MPa para A1B2, 52 MPa para A1B5, 450 MPa para A2B0.5, 16 MPa para A2B2, 646 MPa para A2B5, 1250 MPa para A3B2 y 265 MPa para A3B5. Después se presenta un aumento en el valor de E' hasta llegar a un máximo de 878.7 MPa a 127°C para A1B2, 812 MPa a 144.5°C para A1B5, 1067 MPa a 117.7°C para A2B0.5, 394 MPa a 147°C para A2B2, 373.21 MPa a 110°C para A2B5 y A3B5, y 1089 MPa a 131.5°C para A3B2.

Se observa que los valores de E' disminuyen al aumentar la cantidad de almidón en casi todos los casos, con excepción de A2B0.5. Se observa que el valor de E' aumenta para A1B2 en comparación con QA1, aumenta para A1B5 en comparación con QA1, aumenta para A2B0.5 en comparación con QA2, aumenta para A2B2 en comparación con QA2, aumenta para A2B5 en comparación con QA2, aumenta para A3B2 en comparación con QA3 y aumenta para A3B5 en comparación con QA3. (Tabla 3.4)

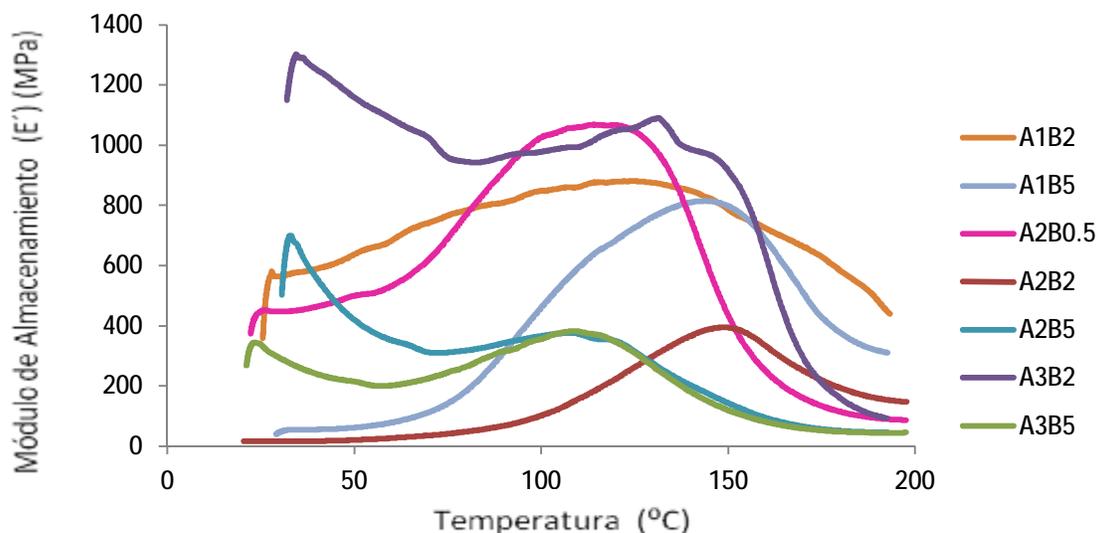


Figura 3.35.- Curvas del módulo de almacenamiento de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B0.5, A2B2, A2B5, A3B2 y A3B5.

En la Figura 3.36 se muestran las curvas de $\tan \delta$ de las películas quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B0.5, A2B2, A2B5, A3B2 y A3B5.

La muestra A1B2 presenta una temperatura de transición de 188 $^{\circ}\text{C}$, A2B2 una T_g de 175 $^{\circ}\text{C}$ y A3B2 presenta una T_g de 1178 $^{\circ}\text{C}$. Las películas A1B5 presenta una T_g de 180 $^{\circ}\text{C}$, A2B0.5 presenta una T_g de 161 $^{\circ}\text{C}$, la T_g para la muestra A2B5 es de 146 $^{\circ}\text{C}$, y para A3B5 es de 141 $^{\circ}\text{C}$.

Algunas muestras con mayor cantidad de almidón presentan una menor temperatura de transición, igual que en el caso de las películas quitosano-almidón. Se observa en algunas

muestras un aumento en los valores de Tg al compararlos con los obtenidos para QA1, QA2 y QA3. En algunos casos, se observa una disminución en la Tg al aumentar la cantidad de extracto o jugo agregado a la mezcla quitosano-almidón. (Tabla 3.5)

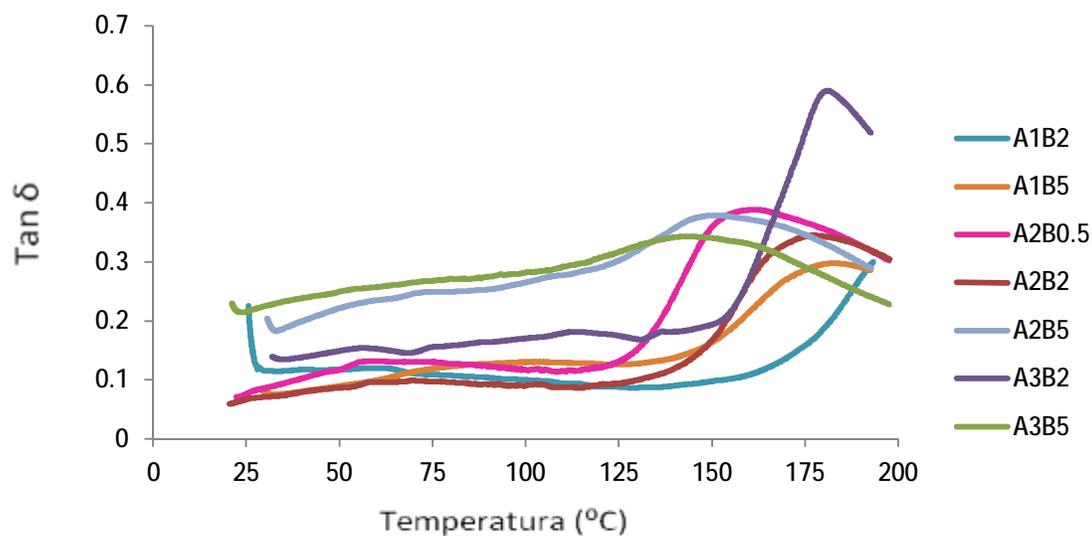


Figura 3.36.- Curva de tan δ de la película quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5, A2B0.5, A2B2, A2B5, A3B2 y A3B5.

En la Figura 3.37 se muestra la curva de almacenamiento de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5. Las regiones que presenta la curva de E' corresponden a las observadas en las curvas de E' de las películas de quitosano-almidón. Sin embargo, se observa una curva más pronunciada que comienza con un módulo muy bajo a 35 °C (47 MPa) y alcanza su valor máximo a los 160 °C (68 MPa). El valor de E' disminuye en comparación con el valor observado en QA1. Esto puede deberse a la adición de arándano a las películas quitosano-almidón. También puede deberse a cambios estructurales en la muestra, producidos por el método de síntesis. (Tabla 3.4)

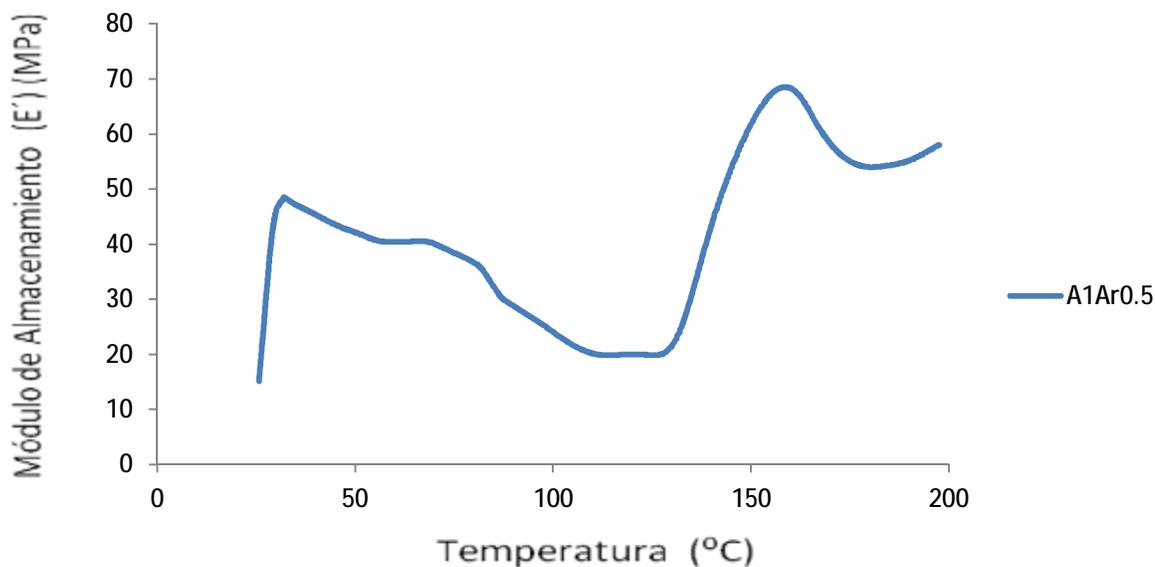


Figura 3.37.- Curva del módulo de almacenamiento de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5.

En la Figura 3.38 se muestra la curva de $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5. Se observa que la temperatura de transición que presenta es de 87 °C. Se observa que la Tg es menor en comparación con el valor de QA1 que es de 148 °C. Esto puede deberse a la adición de arándano. (Tabla 3.5)

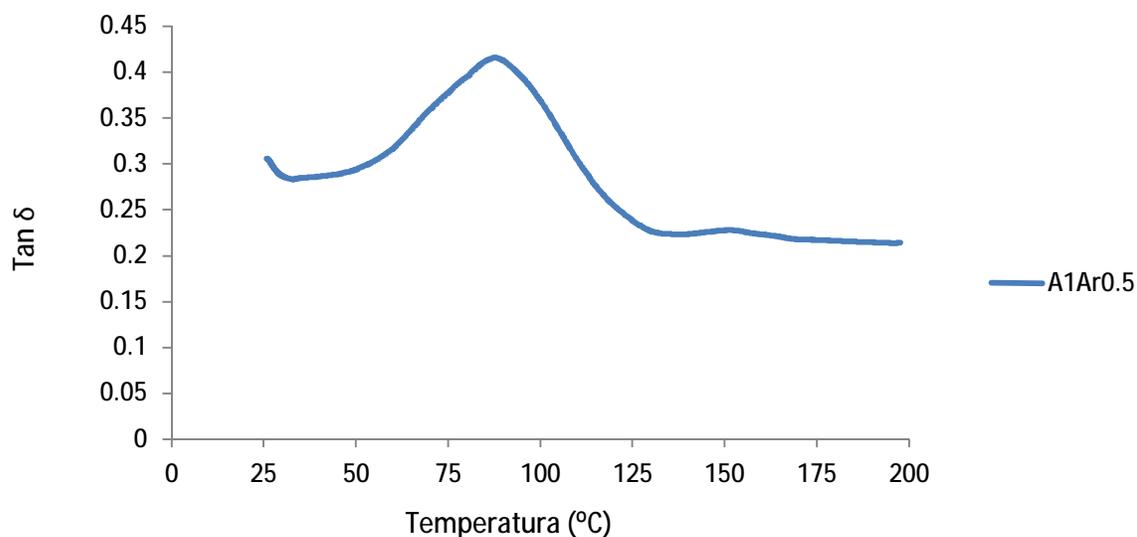


Figura 3.38.- Curva de $\tan \delta$ de la película quitosano-almidón con arándano A1Ar0.5.

Tabla 3.4.- Valores de E' de las películas quitosano-almidón a diferentes temperaturas

Película	35 °C	100 °C	150 °C	180 °C	Valor máximo
QA1	484 MPa	600 MPa	248 MPa	95 MPa	680 MPa (125 °C)
QA2	501 MPa	250 MPa	105 MPa	47 MPa	284 MPa (102 °C)
QA3	262 MPa	245 MPa	67 MPa	25 MPa	250 MPa (100 °C)
A1TV5	65 MPa	515 MPa	365 MPa	140 MPa	680 MPa (125 °C)
A1TN0.5	2190 MPa	1940 MPa	1545 MPa	768 MPa	1944 MPa (111 °C)
A3TN0.5	220 MPa	105 MPa	115 MPa	50 MPa	217 MPa (113 °C)
A1G2	27 MPa	22 MPa	105 MPa	90 MPa	107 MPa (150 °C)
A1G5	56 MPa	25 MPa	97 MPa	120 MPa	127 MPa (176 °C)
A2G2	164 MPa	120 MPa	494 MPa	290 MPa	502 MPa (153 °C)
A2G5	75 MPa	76 MPa	230 MPa	240 MPa	265 MPa (160 °C)
A3G0.5	258 MPa	330 MPa	230 MPa	90 MPa	450 MPa (130 °C)
A3G2	173 MPa	95 MPa	270 MPa	161 MPa	268 MPa (150 °C)
A1B2	577 MPa	840 MPa	780 MPa	400 MPa	878 MPa (127 °C)
A1B5	52 MPa	445 MPa	780 MPa	400 MPa	813 MPa (145 °C)
A2B0.5	450 MPa	1004 MPa	454 MPa	112 MPa	1064 MPa (112 °C)
A2B2	16 MPa	98 MPa	394 MPa	188 MPa	395 MPa (148 °C)
A2B5	646 MPa	355 MPa	150 MPa	51 MPa	377 MPa (108 °C)
A3B2	1250 MPa	977 MPa	940 MPa	125 MPa	1083 MPa (129 °C)
A3B5	265 MPa	350 MPa	135 MPa	51 MPa	375 MPa (107 °C)
A1Ar0.5	47 MPa	27 MPa	60 MPa	53 MPa	68 MPa (160 °C)

Tabla 3.5.- Valores máximos de tan δ para las películas quitosano-almidón

Película	Valor máximo de tan δ	Temperatura °C
QA1	0.387	148 °C
QA2	0.414	156 °C
QA3	0.416	146 °C
A1TV5	0.421	175 °C
A1TN0.5	0.358	192 °C
A3TN0.5	0.37	91 °C
A1G2	0.297	87 °C
A1G5	0.341	173 °C
A2G2	0.268	188 °C
A2G5	0.30	100 °C
A3G0.5	0.424	161 °C
A3G2	0.273	111 °C
A1B2	0.301	188 °C
A1B5	0.297	180 °C
A2B0.5	0.388	161 °C
A2B2	0.345	175 °C
A2B5	0.375	146 °C
A3B2	0.576	178 °C
A3B5	0.343	141 °C
A1Ar0.5	0.415	87 °C

3.7.- Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la Figura 3.39 se muestran las curvas TGA de las películas de quitosano con soluciones de almidón al 1, 2 o 3%. En cada curva TGA se presentan tres pérdidas de peso o eventos térmicos. La primera pérdida de peso se asocia a la eliminación de los solventes residuales (principalmente agua), es decir pérdida de humedad. La segunda pérdida de peso es atribuida a la depolimerización del quitosano y la plastificación del almidón, así como a la descomposición del glicerol (la cual ocurre a temperaturas más bajas que en el caso del almidón). La tercera pérdida se atribuye a la descomposición adicional del quitosano y el

almidón (pirólisis). Las muestras QA2 y QA3, en comparación con QA1, presentan un mayor desplazamiento en el pico derecho de la curva, debido al aumento de la cantidad de almidón (ya que se presenta una mayor plastificación). Todas las curvas presentan una misma forma inicial causada por la acetilación del material. [56] [57] [58]

En la curva TGA de la película QA1, se observa una primera pérdida de peso de 12% en el intervalo de 25.9^o a 122.1 °C. La segunda pérdida de peso con una disminución del 12 al 62.4% ocurre en el intervalo entre 121.1^o a 344.4 °C. La tercera pérdida de peso con una disminución de 62.4 al 95.6% ocurre en el intervalo de 344.4 a 593.7 °C.

En la curva TGA de la película QA2, se observa una primera pérdida de peso de 10% en el intervalo de 31^o a 122.5 °C. La segunda pérdida de peso con una disminución del 10 al 62.22% ocurre en el intervalo entre 122.5^o a 344.4 °C. La tercera pérdida de peso con una disminución de 62.22 al 79.52% ocurre en el intervalo de 344.4 a 594.1°C.

La curva TGA de la película QA3 muestra una primera pérdida de peso de 11.5% en el intervalo de 26^o a 125.8 °C. La segunda pérdida de peso con una disminución del 11.5 al 67.35% ocurre en el intervalo entre 125.8^o a 344.2°C. La tercera pérdida de peso con una disminución del 67.35 al 88.8% ocurre en un intervalo de 344.2 a 595 °C.

Las películas muestran cierta tendencia en su estabilidad térmica en función con la cantidad de almidón. La película con solución de almidón 1% muestra la menor estabilidad térmica. En cambio la película QA2 muestra una relativa mayor estabilidad térmica, en este caso una cantidad media de almidón proporciona las mejores propiedades térmicas. En tanto, la película con solución de almidón al 3% muestra una estabilidad térmica media.

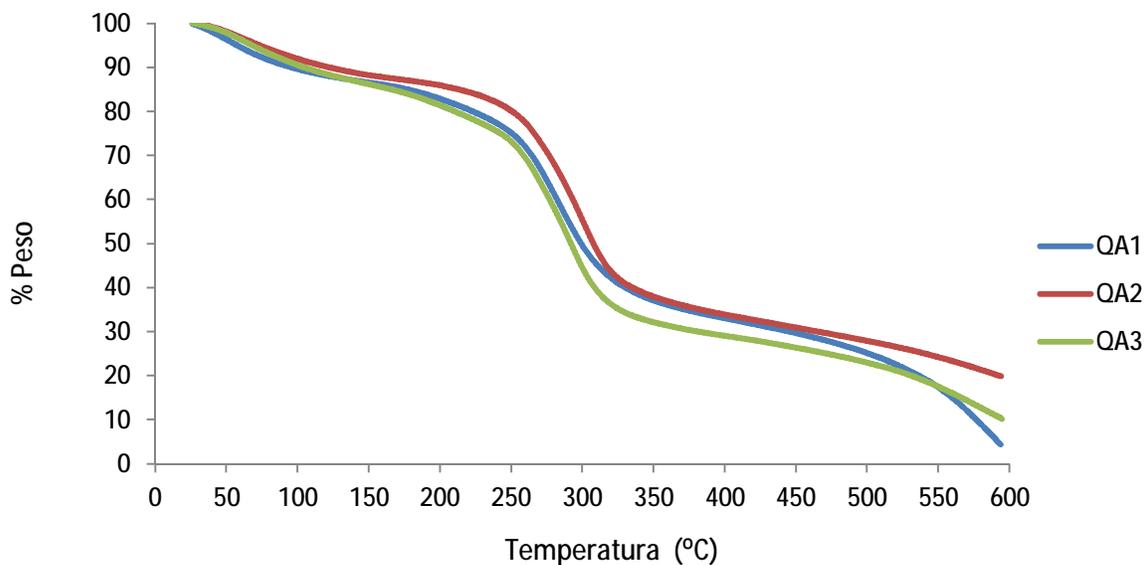


Figura 3.39.- Curvas TGA de las películas quitosano-almidón QA1, QA2 y QA3.

En la Figura 3.40 se muestra la curva TGA de la película de quitosano-almidón con té verde A1TV5 en comparación con la película QA1. La curva TGA de la muestra A1TV5 presenta una mayor pérdida de peso a una temperatura menor que el caso de QA1 alrededor de los 100°C. A1TV5 presenta una mayor pérdida total de peso que QA1.

Los procesos de pérdida de peso son originados por las mismas causas que en las películas quitosano-almidón, además que en la primera pérdida de peso se presenta la eliminación del extracto de té verde al 3% [19]. Esta película muestra una estabilidad térmica menor a la observada en la película de quitosano con almidón al 1% durante la primera y la tercera pérdida de peso.

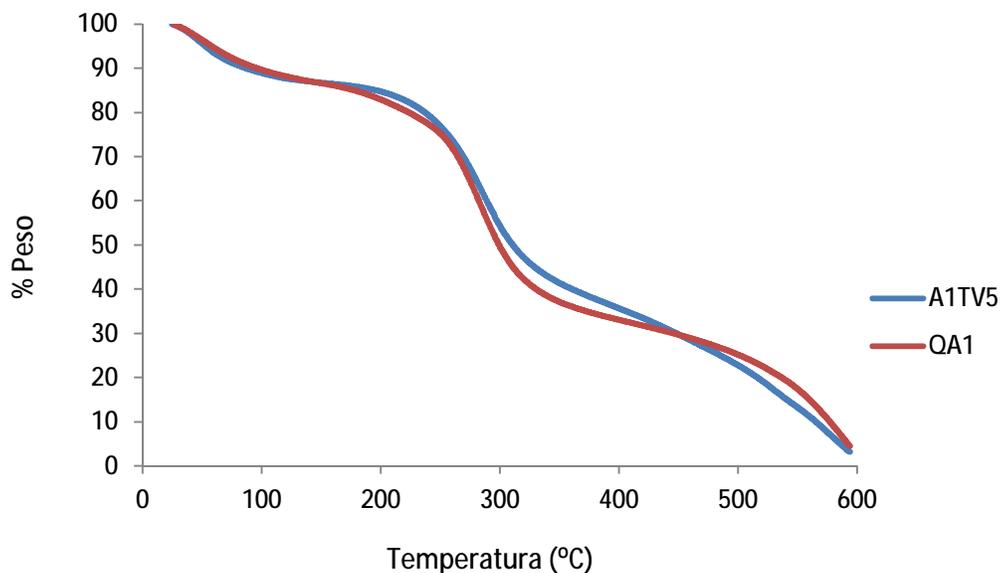


Figura 3.40.- Termogràma comparatiu de la pel·lícula A1TV5 contra QA1.

En la Figura 3.41 se muestran las curvas TGA de las películas de quitosano-almidón con té negro A1TN0.5 y A3TN2 en comparación con QA1 y QA3, respectivamente. En la curva TGA de la película A1TN0.5, se observa un comportamiento muy similar en comparación con QA1. Aunque en la tercera pérdida de peso se observa un valor menor para la muestra A1TN0.5. Se observa también una menor pérdida total de peso en comparación con QA1.

En la curva TGA de la película A3TN0.5, se observa que la primera pérdida de peso es menor en comparación con QA3, y ocurre a una mayor temperatura. Tiene una pérdida total de peso menor que QA3 y mayor estabilidad térmica.

La película A3TN0.5 muestra la mayor estabilidad térmica, lo cual confirma que las películas con almidón al 3% tienen una mayor estabilidad térmica que aquellas elaboradas con almidón al 1%. Analizando los resultados, se nota un aumento en la estabilidad térmica de las películas al agregarles extracto de té negro, comparando los datos con las muestras quitosano-almidón. Los procesos de pérdida de peso son originados por las mismas causas que en las películas quitosano-almidón con té verde.

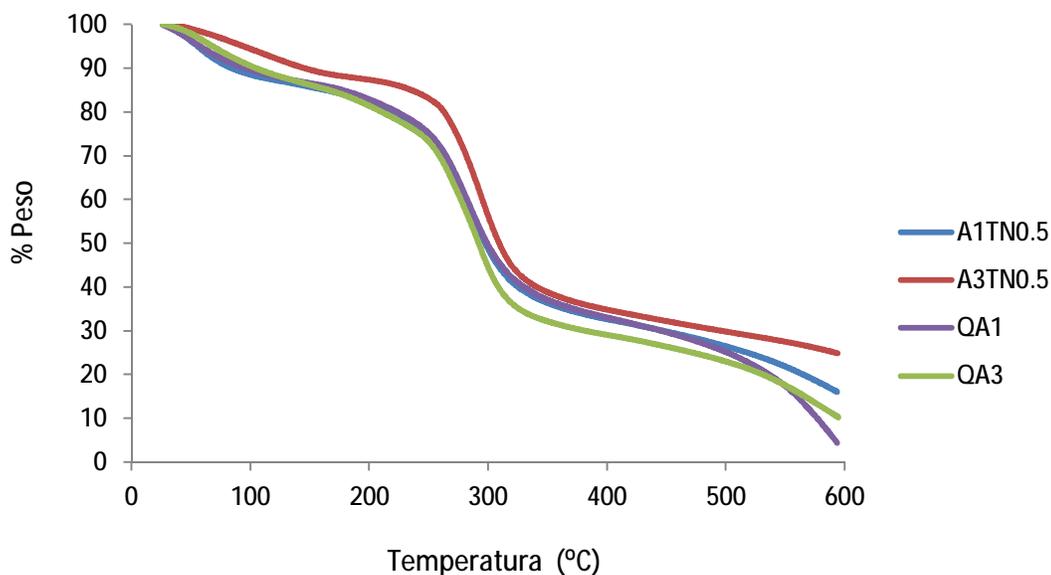


Figura 3.41.- Termograma comparativo de las películas quitosano-almidón A1TN0.5, A3TN2 contra QA1 y QA3.

En la Figura 3.42 se muestran las curvas TGA de las películas de quitosano-almidón con granada A1G5 y A3G5 en comparación con QA1 y QA3, respectivamente. En la curva TGA de la película A1G5, se observa menores pérdidas de peso que ocurre a mayores temperaturas en comparación con QA1. También presenta una mayor estabilidad térmica.

En la curva TGA de la película A3G5 se observa una primera pérdida de peso mayor en comparación con QA3. Pero en la segunda pérdida y tercera pérdida de peso se observan valores menores en comparación con QA3. Se muestra una mayor estabilidad térmica en la película con granada.

Las películas con granada muestran una tendencia similar en su estabilidad térmica, aunque la película A1G5 presenta una estabilidad mayor que A3G5 al final del análisis, lo que no sucede con las películas quitosano-almidón. Se observa que la estabilidad térmica mejora en comparación con las películas quitosano-almidón correspondientes, sobre todo en el caso de QA1 y A1G5.

Los procesos de pérdida de peso son originados por las mismas causas que en las películas quitosano-almidón. En la primera pérdida de peso se presenta la eliminación del extracto de granada. [17]

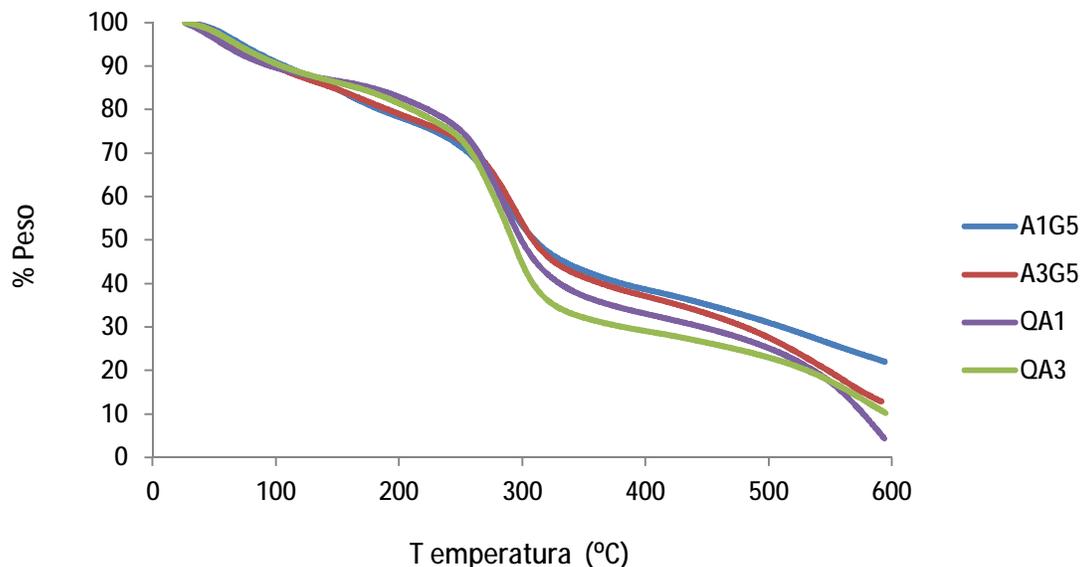


Figura 3.42.- Termograma comparativo de las películas quitosano-almidón con granada A1G5, A3G5 contra QA1 y QA3.

En la Figura 3.43 se muestran las curvas TGA de las películas de quitosano-almidón con betabel A1B2, A1B5 y A2B5 en comparación con QA1 y QA2, respectivamente. En la curva TGA de la película A1B2 se observa que la primera pérdida y la segunda pérdida de peso son mayores que las observadas en QA1. Pero la tercera pérdida de peso es menor. Tiene menor estabilidad térmica que QA1.

En la curva TGA de la película A1B5, se observa que la primera pérdida es muy similar en comparación con QA1. Pero la segunda pérdida de peso y la tercera pérdida de peso son menores que para QA1. Se observa una mejora en la estabilidad térmica al compararse con QA1. También se observa que al parecer el aumento de la cantidad de extracto de betabel otorga una mejora en las propiedades térmicas.

En la curva TGA de las películas A2B5 se observa valores muy similares en las pérdidas de pesos al compararse con los valores obtenidos en QA2. Su estabilidad térmica es similar también.

La mejor propiedad térmica se observa en la muestra A1B5. Estos procesos están relacionados con las mismas causas que producen las pérdidas de peso en la películas quitosano-almidón con granada.

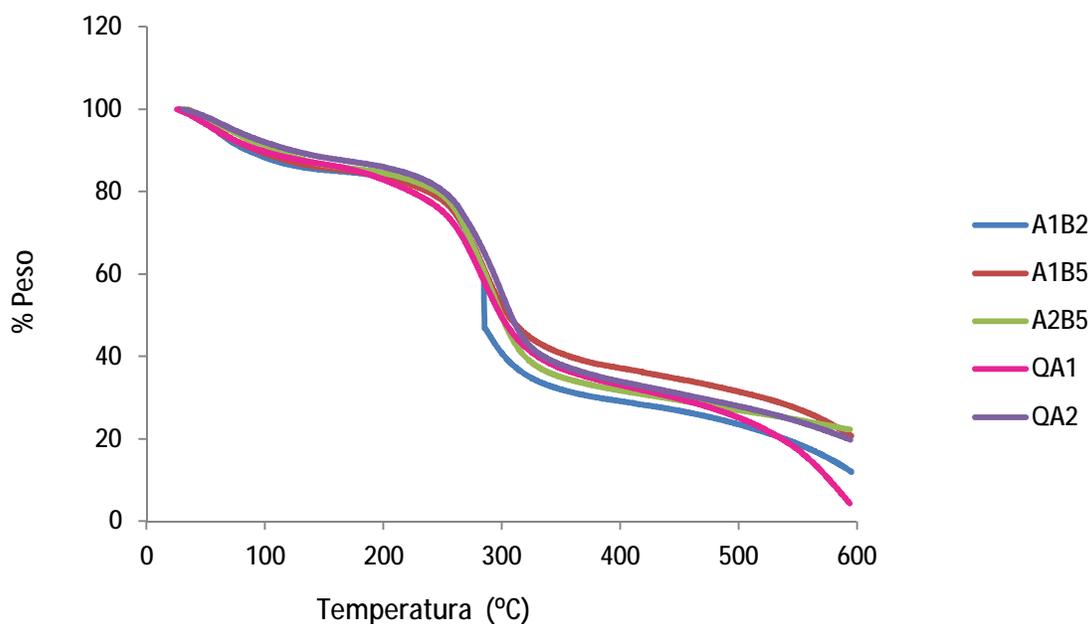


Figura 3.43- Termograma comparatiu de les pel·lícules quitosano-almidón amb betabel A1B2, A1B5 i A2B5 contra QA1 i QA2.

Capítulo 4.- Conclusiones

En las pruebas contra mesofílicos aerobios se pudo observar que las películas con granada fueron las más efectivas, ya que todas inhibieron el crecimiento de éstos. También 4 películas con betabel, 3 con té negro, 1 con té verde y 1 con arándano y QA2 dieron resultados positivos. De las 48 películas, 19 fueron efectivas contra este amplio grupo de microorganismos.

En las pruebas contra hongos, se observó que las películas con betabel fueron las más efectivas contra estos microorganismos, 6 de estas dieron resultados positivos. También 3 películas con granada, 2 con té negro y QA3 mostraron actividad. Las películas con té verde o arándano no mostraron actividad antifúngica. De las 48 películas, 12 fueron efectivas contra las especies de hongos *A. fumigatus*, *A. Níger* y *P. notatum*.

En las pruebas contra levaduras se observó que las películas con granada fueron las más efectivas, 3 de estas dieron resultados positivos. También 2 películas con arándano, 1 con té verde, 1 con té negro, 1 con betabel, QA2 y QA3 mostraron actividad. De las 48 películas, 10 fueron efectivas contra las especies de levadura *S. cerevisiae*.

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas antimicrobianas, se concluyó que las películas más efectivas son aquellas que contienen betabel, arándano o granada. Esto es debido a que las antocianinas tienen propiedades antimicrobianas y presentan una mayor estabilidad en su estructura ante diversos factores como la temperatura y el pH en comparación con las catequinas (presentes en los tés). Se puede suponer que el betabel, el arándano y la granada tienen mayor cantidad de antioxidantes (los cuales también son pigmentos de las plantas, hortalizas y frutas) que los tés debido a que sus extractos presentan una tonalidad más fuerte u oscura comparados con el del té verde o té negro. Casi todas las películas con granada o betabel presentaron actividad antimicrobiana. Las películas con antioxidantes obtenidos del arándano presentaron una actividad antibacterial media, es decir, sólo la mitad de ellas presentan actividad antimicrobiana.

Se cree también que las catequinas presentes en el té verde y té negro pudieron no ser tan efectivas debido a las condiciones de la planta y el proceso dado a las hojas para su uso

comercial. El té negro dio a las películas una mayor actividad que en el caso del té verde, a pesar de que el té negro contiene una menor cantidad de antioxidantes.

No se observó una relación concluyente entre la efectividad antimicrobiana y las cantidades de almidón y extracto o jugo utilizado. Las películas que presentaron actividad antimicrobiana eran de las tres concentraciones de almidón y de diversas cantidades de extracto o jugo. Sin embargo, se observó que la adición de antioxidantes proporcionó actividad antimicrobiana a aquellas películas que no las tenían al solo contener quitosano-almidón. Se comprobó que el quitosano es un efectivo agente antibacterial, pero al serle adicionados antioxidantes naturales se logró que también sea efectivo contra hongos y levaduras.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis FTIR realizados a las muestras, se concluyó que no es posible determinar con total seguridad la presencia de los antioxidantes en las películas, ya que los espectros IR son muy similares para todas, debido a que el quitosano y el almidón también presentan formas cíclicas y enlaces muy parecidos, además de múltiples grupos O-H en sus estructuras. La presencia de los antioxidantes en las películas se comprobó por los resultados obtenidos en los análisis antimicrobianos, DMA y TGA, así como la apariencia de las películas.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis SEM realizados a las muestras, se concluyó que existen tres morfologías diferentes para las películas: óvalo, coliflor y superficie ligeramente rugosa. No se presentó una relación entre los extractos o jugos agregados y la morfología de las películas. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en los análisis TGA, DMA y SEM se concluyó que las morfologías que proporcionan mejores propiedades a las películas son la ligeramente rugosa y la de coliflor.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis DMA realizados a las muestras, se concluyó que en el caso del módulo de almacenamiento las películas con almidón al 1% presentaron los valores más altos, con excepción de las que contienen arándano o granada. Se observó también que al agregar extracto o jugo a las películas de quitosano-almidón aumentaron los valores de E' , con excepción de aquellas que contienen arándano, granada con almidón al 1% o té negro con almidón al 3%. No se observó relación entre el aumento

de la cantidad de extracto o jugo agregado y el aumento o disminución del módulo de almacenamiento. Las películas con betabel obtuvieron los mejores resultados.

En el caso de los valores de $\tan \delta$, se observó que las películas quitosano-almidón y aquellas que contienen extracto o jugo mantienen valores similares, sólo en el caso de las películas con betabel, té negro, algunas de granada y té verde se observó un aumento de $\tan \delta$ y en las películas con arándano y en algunas de granada una disminución. Se observó también que al agregar extracto o jugo aumenta los valores de Tg sobre todo en las películas con almidón al 1%. No se observó relación entre el aumento de la cantidad de extracto o jugo agregado y el aumento o disminución de $\tan \delta$.

De acuerdo con los resultados observados, se mostró que las películas con granada-almidón al 2 o 3%, las películas con betabel o té negro-almidón al 1% tuvieron las mejores propiedades viscoelásticas.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis TGA realizados a las muestras, se concluyó que las películas preparadas con solución de almidón al 2% presentaron la mayor estabilidad térmica, mientras que las películas con almidón al 1% tuvieron la menor estabilidad y las películas con almidón al 2% presentaron valores medios de estabilidad térmica. También se observó un aumento considerable en la estabilidad térmica en las películas con almidón al 1%, al agregar los extractos o jugos con antioxidantes, con excepción del té verde. Los mejores resultados se observaron en las películas con granada y betabel. Al aumentar la cantidad de extracto o jugo agregado, se incrementó la estabilidad térmica. Esto afirma la hipótesis de que las antocianinas aportan mejores propiedades a las películas en comparación con las catequinas.

Se puede concluir que las antocianinas encontradas en la granada y el betabel no solo mejoran las propiedades biocidas de las películas quitosano-almidón, sino también mejoran el módulo de almacenamiento E' , su valor de Tg, su estabilidad térmica, y modifican la morfología.

Bibliografía

- [1] Sánchez- Valdes S. y col., Mechanical and antimicrobial properties of multilayer films with a polyethylene/silver nanocomposite layer, *Journal of Applied Polymer Science*, Wiley Periodicals Inc., Vol. 111, No. 2, enero 2009, p. 953.
- [2] Veiga M. D. y col., El Quitosano: usos farmacéuticos y biológicos, *Revista de la Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos*, Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos, Vol. 14, No. 2, abril - junio 2004, p. 33-42.
- [3] Kenawy, El- Refaie y col., The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state of the Art Review, *Biomacromolecules*, ACS Publications, Vol. 8, No. 5, mayo 2007, p. 953-962.
- [4] Porras, Gina y col; Quitosano n-acilado con cinamaldehido: un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Universidad del País Vasco, Vol. 10, No. 3, mayo 2009, p. 198-199.
- [5] Lárez, Cristóbal, Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica, *UDO Agrícola, Saber ULA*, Vol. 8, No. 1, marzo 2008, p.1-22.
- [6] Lárez, Cristóbal; Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro, *Avances en Química, Saber ULA*, Vol. 1, No. 2, mayo-agosto 2006, p. 15-21.
- [7] Lehninger, Albert; *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*, Ediciones Omega, 5.- edición, España, 1982, p. 255, 269-273.
- [8] White, Abraham; Handler, Philip; Smith, Emil-, *Principios de bioquímica*, McGraw-Hill, 4.- edición, México, 1979, p. 46-48.
- [9] Badui, Salvador; *Química de los alimentos*, Alhambra Mexicana S. A. de C. V., 3.- edición, México, 1993, p. 397, 398.

- [10] Autores varios, Enciclopedia Universal Ilustrada Tomo 59, ESPASA-CALPE S.A., 1.- edición, España, 1979, p. 1123-1129.
- [11] Rentería, Karla; La granada, una nueva fórmula para la buena salud, Más Garceta, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Vol. 13, agosto 2011, p. 8-9.
- [12] Autores varios, Enciclopedia Universal Ilustrada, Tomo 50, ESPASA-CALPE S.A., 1.- edición, España, 1979 pág. 742-746.
- [13] Vaughan, John; Geissler, Catherine; The New Oxford Book of Food Plants, Oxford University Press, 13.- edición, 2009, p. 92.
- [14] Vilaplana, Montse; Antioxidantes presentes en los alimentos, Ámbito Farmacéutico, Elsevier, Vol. 26, No. 10, noviembre 2007, p. 79-86.
- [15] Dai, Jin y col., Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties; Molecules, MDPI AG, Vol.15, No. 10, octubre 2010, p. 7314-7316.
- [16] Valenzuela, Alfonso; El consumo del té y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria, Revista Chilena de Nutrición, Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología, Vol. 31, No. 2, agosto 2004, p. 74-76.
- [17] de Luis D.A. y col., Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular, Anales de Medicina Interna, Arán Ediciones, Vol. 25, No. 3, marzo 2008, p. 105.
- [18] Garzón, Gloria; Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión; Acta biológica, Universidad Nacional de Colombia, Vol. 13 No. 3, septiembre-diciembre 2008, p. 28 – 30.
- [19] Cuevas, Elyana y col; Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano, Memorias del encuentro final Alfa Lagrotech, Red Alfa Lagrotech, septiembre 2008, p. 83-85.

- [20] Burdon, Kenneth; Williams, Robert; Microbiología, Publicaciones Cultura S.A., 7.-reimpresión, México, 1983, p. 7.
- [21] Solomon, Eldra; Berg, Linda; Martin, Diana; Biología, McGraw-Hill, 5.- edición, México, 2001, p. 492-503.
- [22] Carpenter, Philip; Microbiología, Nueva Editorial Interamericana S. A. de C.V., 2.- edición, México, 1977, p. 144-145, 150-157, 218, 334-335, 376.
- [23] Thatcher, F.S., Clark, D.S., Análisis microbiológico de los alimentos, Acribia, 1.- edición, España, 1973, p. 31-33.
- [24] Pelczar, Michael; Reid, Roger; Chan, E.; Microbiología, McGraw-Hill, 4.- edición, México, 1988, p. 96, 247-257, 271-287.
- [25] Rodriguez, Ana; Formulación y elaboración de una tintura con acción antiséptica cicatrizante a base del apio (*Apium graveolens*. L), Tesis de Maestría, Universidad Nueva San Salvador, El Salvador, 2005, p.13-16.
- [26] Fuerst, Robert, Microbiologia de Frobisher y Fuerst, Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V, 14.- edición, México, 1981, p. 467-468.
- [27] Walker, Stuart; Microbiología, McGraw-Hill, 4.- edición, México, 2000, p. 335-338.
- [28] Trobisher, Martin; Sommermeyer, Lucille; Goodale, Raymond; Microbiología y patología para enfermeras, Interamericana, 5.- edición, México, 1962, p. 23.
- [29] Pontón, José y col., Hongos y Actinomicetos Alergénicos, Revista Iberoamérica de Micología, Asociación Española de Micología, Vol. 19, enero 2002, p. 39-40.
- [30] Stevens, Malcom; Polymer chemistry, Oxford University Press, 3. - edición, Estados Unidos de América, 1990, p. 491.

[31] Fernandez-Saiz y col., Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area, *Food Hydrocolloids*, Elsevier Ltd, Vol. 23, No. 3, mayo 2009, p. 913-921.

[32] Rivero, Deyanira y col, Actividad antifúngica in vitro de la quitosana Sigma frente a hongos fitopatógenos causantes del manchado del grano en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), *Fitosanidad*, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Vol. 13, No. 2, abr.-jun. 2009, p. 101-108.

[33] Tripathi, Shipra y col., Chitosan–silver oxide nanocomposite film: Preparation and antimicrobial activity, *Bulletin of Material Science*, Indian Academy of Sciences, Vol. 34, No. 1, febrero 2011, India, p. 29–35.

[34] Stoicov, Calin y col., Green tea inhibits *Helicobacter* growth in vivo and in vitro, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Elsevier Ltd, Vol.33, No.5, mayo 2009, p. 473-478.

[35] Ferrazzano, Gianmaria F. y col., Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea), *Fitoterapia*, Elsevier Ltd, Vol. 80, No. 5, julio 2009, p. 255-262.

[36] Peng, Qing y col., Green Tea Extract Weakens the Antibacterial Effect of Amoxicillin in Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* Infected Mice, *Phytotherapy Research*, Wiley Interscience, Vol. 24, No. 1, enero 2010, p. 141-145.

[37] Chakraborty Devjani y col., Bioassay-guided isolation and identification of antibacterial and antifungal component from methanolic extract of green tea leaves (*Camellia Sinensis*), *Research Journal of Phytochemistry*, Academic Research Journey, Vol.4, No. 2, abril-junio 2010, p. 78.

[38] McCarrell, Erin y col., Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, BioMed Central, Vol.8, No. 1, diciembre 2008, p. 1-7.

[39] Steiberg, Doron y col., Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, The British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 54, No. 1, mayo 2004, p. 86–89.

[40] Dahham, Saad y col., Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*), *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, IDOSI Publications, Vol. 9, No.3, 2010, p. 273-281.

[41] Johnson, Brandy y col., Media acidification by *Escherichia coli* in the presence of cranberry juice, *BMC Research Notes*, BioMed Central, Vol. 2, No. 226, noviembre 2009, p. 1-4

[42] Delgado Liliana y col., Syntesis and Characterization of chitosan-starch films reinforced with TiO₂ nanoparticles, *Memorias del XIX International Material Research Congress*, Material Research Society y Sociedad Mexicana de Materiales A. C., México, agosto 2010, p. 65.

[43] 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, 10 de mayo de 1995.

[44] 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, 10 de noviembre de 1995.

[45] 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.

[46] García, Ricardo; Síntesis de materiales poliméricos para uso biomédico a partir de dextran/quitosano/gelatina, *Tesis de Doctorado*, DEPI del ITCM, México, mayo 2008, p. 46-48.

[47] Sawyer, Linda; Grubb, David; Meyers, Gregory; *Polymer microscopy*, Springer, 3. - edición, USA, 2008, p. 35-41.

- [48] A de H. y col., *Characterization and Analysis of Polymers*, Wiley-Interscience, Estados Unidos de América, 2008, p. 649-650.
- [49] Willard, Habort y col., *Métodos instrumentales de análisis*, Grupo Editorial Iberoamérica, 7.- edición, México, 1991, p. 753-755.
- [50] Koneman, Elmer y col., *Diagnostico Microbiológico*, Editorial Médica Panamericana, 1.- edición, Argentina, 1983, p. 108-111.
- [51] Hernández, H. y col., *Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón*, *Superficies y Vacío*, Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, Vol. 22, No. 3, septiembre 2009, p. 58.
- [52] Salleh, Eraricar y col., *Structural Characterization and Physical Properties of Antimicrobial (AM) Starch Based Films*, *World Academy of Science, Engineering and Technology*; *International University of Science, Engineering and Technology*, No. 31 , julio 2009, p. 434-435.
- [53] Al-Sagheer, F.A. y col., *Visco-elastic properties of chitosan–titania nano-composites*, *Carbohydrate Polymers*, Elsevier Ltd., Vol. 85, No.2, mayo 2011, p. 360-361.
- [54] Sakurai, K. y col., *Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(*N*-vinyl pyrrolidone) blends*, *Polymer*, Elsevier Ltd., Vol.41 , No. 19, septiembre 2000, p.7050-7055.
- [55] Gartner, Carmiña y col., *Interplay between Structure and Dynamics in Chitosan Films Investigated with Solid-State NMR, Dynamic Mechanical Analysis, and X-ray Diffraction*, *Biomacromolecules*, Vol. 12, No.4, marzo 2011, p. 1384-1385.
- [56] Mina, José y col., *Caracterización Físicoquímica del Almidón Termoplástico de Yuca Natural y Acetilada*, *DYNA*, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Año 78, No. 166, abril 2011, p.169.

[57] Benavides, Luis y col., 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, Universidad del País Vasco, Vol. 11, No. 7, diciembre 2010, p.561-562.

[58] Yang, Dong y col., Chitosan/TiO₂ nanocomposite pervaporation membranes for ethanol dehydration, Chemical Engineering Science, Elsevier Ltd., Vol. 64, No. 13, p.3133.