



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

**ITM**

**“CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO Y  
*Moringa oleifera* COMO ALTERNATIVA DE MATERIAL DE  
ENVASE”**

OPCIÓN  
**TESIS PROFESIONAL**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:  
**I.Q. DANIEL IVÁN CHAN MATÚ**

ASESOR:  
**DR. VÍCTOR MANUEL TOLEDO LÓPEZ**

CO-ASESORA:  
**DRA. MARÍA DE LOURDES VARGAS Y VARGAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020



"2020. Año de Leona Vicario. Benemérita Madre de la Patria"

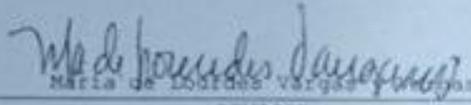
X. 055/20

Mérida, Yucatán, **10/enero/2021**

**ASUNTO:** Solicitud de autorización de impresión.

**HEPMILA ANDREA ULIBARRI BENÍTEZ**  
Representante de la División de Estudios  
de Posgrado e Investigación  
**PRESENTE**

En virtud de que el C. Daniel Iván Chan Mató, ha culminado satisfactoriamente la tesis "Caracterización de películas de quitosano y Moringa oleifera como alternativa de material de envase ", participando exitosamente en el Seminario de Investigación de la misma y cubierto los requisitos necesarios para optar al grado de "Maestro en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología" le solicitamos se le otorgue la autorización correspondiente para realizar la impresión de su trabajo final, el cual avala como un producto de calidad la Comisión Revisora conformada por los que a continuación firman.

DIRECTOR	CODIRECTORA
 Víctor Madero Toledo López	 María de los Ríos Vargas
REVISORA	REVISOR
 Susana Hincón Arriaga	 Tomás Jesús Madera Santana

**ATENTAMENTE**  
Excelencia en Educación Tecnológica.

  
Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez  
Coordinadora de la Maestría en Ciencias  
de los Alimentos y Biotecnología  
C.p. Archivo



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLOGÍAS  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Mérida

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
No. DE OFICIO: X-074/20  
Mérida, Yucatán, **18/febrero/2020**

**ASUNTO:** AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

**C. DANIEL IVÁN CHAN MATÚ**  
**PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**  
**Y BIOTECNOLOGÍA**  
**PRESENTE.**

De acuerdo al fallo emitido por su director **Víctor Manuel Toledo López**, codirectora **María de Lourdes Vargas y Vargas** y la comisión revisora integrada por Susana Rincón Arriaga y Tomás Jesús Madera Santana, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO Y Moringa Oleifera COMO ALTERNATIVA DE MATERIAL DE ENVASE"**

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica*

**HERMILA ANDREA ULIBARRI BENÍTEZ**  
**JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



S.E.P.  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE MERIDA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo  
HAUB/rja



# Índice

<b>Índice</b> .....	i
<b>Lista de Tablas</b> .....	iv
<b>Lista de Figuras</b> .....	iv
<b>Abreviaturas</b> .....	v
<b>Resumen</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>Capítulo 1</b> .....	1
<b>1.1 Introducción</b> .....	1
<b>1.2 Antecedentes</b> .....	3
1.2.1 Generalidades de los envases .....	3
1.2.2 Materiales poliméricos en envases alimentarios .....	3
1.2.3 Biopolímeros como material de envases .....	4
1.2.4 Envases activos (EA) .....	5
1.2.5 Películas y recubrimientos comestibles.....	6
1.2.5.1 Aditivos.....	8
1.2.6 Mecanismos de formación de las películas.....	11
1.2.7 Quitosano .....	13
1.2.7.1 Actividad antimicrobiana y antifúngica del quitosano .....	14
1.2.8 <i>Moringa oleifera</i> .....	15
1.2.8 Películas de quitosano incorporado con antioxidantes.....	16
<b>1.4 Objetivos</b> .....	18
1.4.1 Objetivo general.....	18
1.4.2 Objetivos específicos .....	18
<b>Capítulo 2</b> .....	19
<b>2.1 Metodología</b> .....	19
2.1.1 Estrategia de trabajo.....	19
2.1.2 Recolección de la materia prima .....	20
2.2 Análisis proximal de las hojas y flores de <i>Moringa oleifera</i> .....	20

2.3	Análisis de compuestos bioactivos.....	20
2.3.1	Contenido de fenoles totales .....	20
2.3.2	Contenido de vitamina C .....	21
2.3.3	Contenido de flavonoides totales .....	21
2.3.4	Contenido de $\beta$ -carotenos .....	22
2.4	Formulación de películas comestibles.....	22
2.4.1	Obtención del extracto de <i>Moringa oleifera</i> .....	22
2.4.2	Sólidos totales del extracto de Moringa.....	23
2.4.3	Obtención de películas comestibles .....	23
2.5	Caracterización de las películas formuladas .....	24
2.5.1	Propiedades fisicoquímicas de las películas .....	24
2.5.1.1	Espesor y densidad aparente .....	24
2.5.1.2	Contenido de humedad .....	24
2.5.1.3	Porcentaje de solubilidad .....	25
2.5.2	Propiedades ópticas.....	25
2.5.2.1	Transmisión de luz y opacidad .....	25
2.5.2.2	Color .....	26
2.5.3	Propiedades mecánicas .....	26
2.5.3.1	Resistencia a la tensión, porcentaje de elongación y módulo de elasticidad .....	26
2.5.3.2	Determinación de la resistencia al rasgado.....	27
2.5.4	Velocidad de Transmisión de Vapor de Agua (VTVA) .....	27
2.5.5	Análisis morfológico.....	28
2.5.6	Propiedades estructurales.....	28
2.5.7	Propiedades activas.....	28
2.5.7.1	Actividad antioxidante por el método ABTS .....	29
2.5.7.2	Antioxidante por el método DPPH .....	29
2.6	Análisis estadístico.....	29
	<b>Capítulo 3</b> .....	<b>30</b>
	<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>30</b>
3.1	Caracterización de la materia prima.....	30
3.1.1	Análisis proximales.....	30
3.1.2	Análisis de compuestos bioactivos .....	32

3.2 Caracterización de las películas formuladas .....	35
3.2.1 Características fisicoquímicas de las películas formuladas .....	35
3.2.1.1 Espesor y densidad.....	36
3.2.1.2 Contenido de humedad .....	37
3.2.1.3 Porcentaje de Solubilidad .....	37
3.2.3 Propiedades ópticas.....	39
3.2.3.1 Transmisión de la luz y opacidad de las películas .....	39
3.2.3.2 Evaluación de color.....	40
3.2.4 Propiedades mecánicas .....	44
3.2.4.1 Resistencia a la tensión (RT) .....	44
3.2.4.2 Rasgado.....	46
3.2.5 Velocidad de Transmisión de Vapor de Agua (VTVA) .....	48
3.2.6 Propiedades estructurales.....	49
3.2.6.1 Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier .....	49
3.2.7 Morfología de las películas formuladas .....	54
3.2.8 Propiedades activas.....	57
3.2.8.1 Fenoles totales y actividad antioxidante .....	57
<b>3.3 Conclusiones.....</b>	<b>60</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>61</b>

## Lista de Tablas

Tabla 1. Contenido de aminoácidos presentes en las hojas de Moringa .....	15
Tabla 2. Formulaciones de las películas .....	24
Tabla 3. Resultados de los análisis proximales de las flores y hojas de <i>Moringa oleifera</i> ..	30
Tabla 4. Resultados del análisis de compuestos bioactivos de las hojas y flores de <i>Moringa oleifera</i> .....	32
Tabla 5. Resultados de espesor, densidad, contenido de humedad y porcentaje de solubilidad .....	36
Tabla 6. Efecto sobre la evaluación de color de las películas .....	43
Tabla 7. Transmisión de la luz (%T) y opacidad.....	43
Tabla 8. Resultados de las pruebas de tensión.....	44
Tabla 9. Resultados de las pruebas de rasgado.....	47
Tabla 10. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH y ABTS.....	57
Tabla 11. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante .....	58

## Lista de Figuras

Figura 1. Estrategia de trabajo .....	19
Figura 2. Velocidad de transmisión de vapor de agua. Letras diferentes indican diferencia significativa con una $p \leq 0.05$ por la prueba de Duncan. ....	48
Figura 3. Espectros infrarrojos de las películas formuladas .....	53
Figura 4. Micrográficas de las películas formuladas.....	56

## Abreviaturas

#: Porcentaje

% Er: Porcentaje de elongación a la ruptura

% p/p: Porcentaje peso a peso

μL: Microlitros

°C: Grados Celsius

a: Parámetro de cromaticidad rojo-verde

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

ASTM: American Society of Testing Materials

b: Parámetro de cromaticidad amarillo-azul

C: Intensidad de color

CIELab: Commission Internationale d'Eclairage (Comisión Internacional de Iluminación)

cm<sup>2</sup>: Centímetros cuadrados

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EAA: Equivalentes de ácido ascórbico

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EQ: Equivalentes de quercetina

ELN: Extracto Libre de Nitrógeno

Er: Elongación a la ruptura

ER: Equivalentes de rutina

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ET: Equivalentes de Trolox

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

g: Gramos

h: Horas

Kg: Kilogramos

Kgf kilogramo fuerza

L\*: Luminosidad

ME: Módulo elástico

mg: Miligramos  
mL: Mililitros  
mm: Milímetros  
mm<sup>2</sup>: Milímetros cuadrados  
MPa: Mega pascales  
N: Newtons  
nm: Nanómetros  
ppm: Partes por millón  
RT: Resistencia a la tensión  
s: Segundos  
SEM: Scanning Electron Microscopy  
UV-Vis: Ultravioleta-visible  
VTVA: Velocidad de transmisión al vapor de agua  
β-C: Beta-carotenos  
ΔE: Diferencia total de color

## Resumen

La adición de componentes activos, en especial los antioxidantes, y de plastificantes como el glicerol, son buenos métodos para mejorar las propiedades de las películas comestibles. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de extracto de *Moringa oleifera* y glicerol en películas de quitosano. Se incorporaron dos concentraciones de extracto (0.07 y 0.15% en peso) y dos concentraciones de glicerol (20 y 40% en peso) y se evaluó el efecto en sus propiedades físicas, mecánicas, ópticas, de barrera, estructurales, morfológicas y activas. En las propiedades físicas, la incorporación de plastificante aumentó los valores de densidad, la humedad y la solubilidad fue afectada por la presencia de los extractos. Las películas con 40% en peso de glicerol exhibieron un efecto antiplastificante y esto se observó en los valores de resistencia a la tensión ( $R_t$ ) y porcentaje de elongación a la ruptura ( $\%E_r$ ). Para las propiedades ópticas, los compuestos fenólicos presentes en los extractos actuaron como barrera en contra la transmisión de luz. La velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) disminuyó por la presencia de los extractos en comparación de las películas control. En las propiedades estructurales, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) reveló que la estructura de las películas fue modificada ligeramente. Las micrografías electrónicas de barrido mostraron que las películas fueron homogéneas y en las películas con 40% glicerol presentaron dos fases en la superficie. En las propiedades activas, las películas con 40 % de glicerol y 0.15% de extracto exhibieron la mayor concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

## Abstract

The addition of active components, especially antioxidants, and plasticizers (glycerol) are good methods to improve the properties of edible films. The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of *Moringa oleifera* extract and glycerol in chitosan films. Two concentrations of extract (0.07 and 0.15 wt%) and two concentrations of glycerol (20 and 40 wt%) were incorporated and the effect on its physical, mechanical, optical, barrier, structural, morphological and active properties was evaluated. In the physical properties, the incorporation of plasticizer increased the values of density, humidity and solubility was affected by the presence of the extracts. The films with 40% by weight of glycerol exhibited an antiplasticizing effect and this was observed in the values of tensile strength (TS) and percentage of elongation at break (% E<sub>b</sub>). In the optical properties, the phenolic compounds present in the extracts was a barrier against the transmission of light. The water vapor transmission rate (WVTR) decreased due to the presence of extracts in comparison to control films. In structural properties, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) revealed that the structure of the films was modified slightly. The scanning electron micrographs showed that the films were homogeneous and in the films with 40% glycerol presented two phases on the surface. In active properties, films with 40% glycerol and 0.15% extract exhibited the highest concentration of phenolic compounds and antioxidant activity.

# Capítulo 1

## 1.1 Introducción

En los últimos años, el uso de películas o recubrimientos a base de materiales biodegradables ha tenido una gran popularidad, esto es debido a que el uso de materiales degradables disminuye el uso de envases hechos de polímeros sintéticos (Capitani et al., 2016). Hoy en día, para el desarrollo de películas biodegradables, se usan biopolímeros de diferentes composiciones, como los polisacáridos, proteínas y lípidos o una combinación de éstos (Capitani et al., 2016; Dos Santos Caetano et al., 2018).

El quitosano se obtiene de la desacetilación de la quitina (es el polímero natural más abundante después de la celulosa), siendo un copolímero natural de carbohidratos con unidades repetidas de  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa y  $\beta$  (1-4)-2-amino-D-glucosa (Shahidi et al., 1999). Se ha demostrado que el quitosano es una sustancia no tóxica, biodegradable, biocompatible e insoluble en agua, pero soluble en solventes acidificados (Rodríguez-Núñez et al., 2014). En soluciones ácidas, los grupos aminos de las moléculas de quitosano son protonados a  $\text{NH}^{3+}$  adquiriendo cargas positivas (Ye et al., 2008) lo que permite interacciones electrostáticas con grupos aniónicos en un entorno ácido (Xu et al., 2005). Debido a esta propiedad de formación de película, el quitosano es un material para producir envases de alimentos, especialmente como películas y recubrimientos comestibles (Rivero et al., 2009).

Las películas poliméricas pueden ser vehículos de sustancias que mejoran las propiedades de las películas, se pueden adicionar, vitaminas, colorantes, agentes antimicrobianos y antioxidantes, la incorporación de antioxidantes en las matrices poliméricas evita la degradación y oxidación de los alimentos aumentando la vida útil de estos. Diversos autores han incorporado antioxidantes sintéticos y naturales en las películas comestibles de quitosano, por ejemplo, Blanco-Fernandez et al. (2012) incorporando  $\alpha$ -tocoferol; Pastor et al., (2013) resveratrol; Wang et al., (2018) extracto de semilla de soja negra; Ruíz-Navajas et al. (2013) aceite esencial de *Thymus moroderi* y *Thymus piperella*; Xiao et al. (2010) extracto de romero, siendo los extractos y los aceites esenciales de plantas los más aceptados por los consumidores.

*Moringa oleifera* es la especie más conocida del género *Moringa*. Es un árbol originario del sur del Himalaya, el nordeste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán. Se encuentra diseminado en una gran parte del planeta, y en América Central fue introducida en los años 1920 como planta ornamental y para cercas vivas (Saucedo-Pompa et al., 2018). Las plantas de *Moringa* tienen una amplia gama de compuestos bioactivos que se pueden obtener de diferentes estructuras vegetativas, como las hojas, semillas, tallo y vainas, estas moléculas bioactivas incluyen carbohidratos, compuestos fenólicos, aceites, entre otros compuestos y tiene un gran potencial para ser utilizados en formulaciones de productos alimenticios (Saucedo-Pompa et al., 2017). Los principales compuestos fenólicos de la *Moringa oleifera* son los flavonoides, Nouman et al. (2016) reportan 12 flavonoides presentes en el árbol de *Moringa*, de los cuales destacan la quercetina, kaempferol y apigenina.

La presente investigación muestra la determinación proximal y de compuestos bioactivos de las hoja y flores de *Moringa oleifera* recolectados en la ciudad de Mérida, Yucatán con el fin de comparar los resultados con lo reportado en la literatura. El estudio de estas propiedades, permitirá conocer en cuál de estas dos partes de la planta presentan la mayor cantidad de compuestos bioactivos, con la finalidad de preparar y caracterizar películas a base de quitosano, incorporando extracto de *Moringa oleifera* plastificadas con glicerol y evaluar su efecto en las propiedades físicas, mecánicas, de barrera, ópticas, estructurales, morfológicas y bioactivas de las películas formuladas.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Generalidades de los envases

El término envase se puede definir como aquel recipiente fabricado con cualquier material o combinación de materiales, destinados a contener mercancías para uso o consumo, protegiéndolo de posibles alteraciones y permitiendo su comercialización (Cervera-Fantoni, 2003).

Una de las principales funciones de los envases en el área alimentaria es conservar la calidad del alimento contenido, protegiéndolo de los cambios físicos, químicos y de las condiciones ambientales, tales como la humedad, el oxígeno, el dióxido de carbono y otros gases como sabores y aromas (Mathlouthu, 2013).

Los materiales más comunes para el uso como envases son: cartón, papel, latas de aluminio y los plásticos (Risch, 2009). Los plásticos de gran consumo utilizados en la elaboración de envases son materiales poliméricos derivados de hidrocarburos como el polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET) y poliestireno (PS), estos materiales ofrecen gran versatilidad al permitir la combinación de materiales para formar compuestos o composites, además de su disponibilidad a gran escala, bajo costo de producción y buenas propiedades de barrera (Tharanathan, 2003).

### 1.2.2 Materiales poliméricos en envases alimentarios

Los polímeros presentan características de transparencia, luminosidad y buenas propiedades mecánicas. Klopffer y Flaconnèche (2001) mencionan que las principales características de un polímero para ser seleccionado como envase alimentario son:

- Propiedades físico-mecánicas: punción, rasgado, tensión, impacto y elongación
- Propiedades de barrera: permeabilidad a los gases (aromas, olores, dióxido de carbono, vapor de agua y de oxígeno)
- Propiedades ópticas (transparencia y opacidad)

Estos factores están relacionados directamente a la protección de las características fisicoquímicas, organolépticas y biológicas del alimento a contener. Los materiales de envase deben tener la suficiente fuerza para resistir la punción, soportar las flexiones sucesivas y tolerar las tensiones mecánicas sufridas durante la manipulación y a lo largo de la cadena de distribución (Peterson, 1970; Mueller, 1982; Gajdos et al., 2004). Las condiciones que se deben de tener en cuenta en las propiedades mecánicas son la ductilidad, resistencia a la rotura, resistencia al impacto y al desgarre y la adherencia entre las distintas capas en películas multicapa (Navarro et al., 2007; Meneses y Valenzuela, 2008).

Las propiedades ópticas (opacidad y transparencia) influyen sobre la conservación de la calidad de los productos debido a que la radiación estimula los cambios oxidativos y auto-oxidativos de las grasas y aceite, modificación de proteínas y desintegración de vitaminas, como la vitamina C (Bossett et al., 1994). Por otra parte, la permeabilidad a los gases y vapor de agua está relacionado por la naturaleza del polímero (espesor, cristalinidad y relación masa-volumen), así como del gas (tamaño de molécula, presión y temperatura), el material de envase no debe ceder al alimento componentes del mismo que comprometan su integridad, pero tampoco debe permitir que el alimento pierda algún componente mayoritario, como los aromas (Klopffer y Flaconneche, 2001; Méndez y Cárdenas, 2010).

### 1.2.3 Biopolímeros como material de envases

El desarrollo de polímeros sintéticos en el siglo XXI es considerado como uno de los grandes avances, debido a los usos en la industria y en la vida cotidiana (López, 2011). Los polímeros sintéticos se obtienen principalmente a partir del petróleo, éstos tienen diversas ventajas: son económicos, livianos, resistentes a la oxidación, aislantes de la corriente eléctrica e inalterables a los agentes atmosféricos (Valero-Valdivieso et al., 2013). Así mismo presentan ventajas y desventajas, por ejemplo, la alta resistencia a la corrosión, al agua y a la descomposición bacteriana los convierte en residuos difíciles de eliminar y generando un grave problema ambiental, por ejemplo, el polietileno y el polipropileno (bolsas plásticas) pueden tardar hasta 500 años en descomponerse (Gross y Kalra, 2002). El mundo consume un millón de bolsas plásticas por minuto, es decir, más de 500 billones al año (Novo, 2009).

Una de las soluciones para este problema es el uso de los biopolímeros, que en su gran mayoría proceden de recursos renovables (Philip et al., 2013). Los bioplásticos como el ácido poliláctico (PLA), pueden procesarse mediante las mismas tecnologías que los materiales termoplásticos, tales como extrusión, inyección o soplado (Villada y Acosta, 2007).

Vieira et al. (2011) clasifican en cuatro categorías a los polímeros biodegradables y esta se basa según la ruta sintética que se sigue para obtenerlos.

- 1) Polímeros obtenidos a partir de biomasa, tales como polisacáridos (almidones, productos lignocelulósicos, pectinas, quitosano/quitina), proteínas y lípidos.
- 2) Polímeros obtenidos por producción microbiana, como el poli(hidroxi-alcanoatos).
- 3) Polímeros sintetizados químicamente usando monómeros obtenidos de recursos agrícolas como el ácido poliláctico (PLA).
- 4) Polímeros cuyos monómeros se obtienen por síntesis química a partir de recursos fósiles, por ejemplo, poliesteramidas (PEA) y copoliésteres alifáticos (PBSA).

#### 1.2.4 Envases activos (EA)

Un envase activo se define como aquel material de elaboración que aprovecha la interacción del sistema alimento-envase-entorno, actuando de forma coordinada para mejorar la calidad y salubridad del alimento envasado al extender su vida útil e incluso, mejorar las propiedades sensoriales del mismo (Catala y Gavara, 2001). La utilización de los materiales poliméricos para el desarrollo de envases activos es precisamente el aprovechamiento positivo de los procesos de transferencia de masa (migración, sorción y permeabilidad) que ocurre entre el polímero y el ambiente o producto contenido, para que, en lugar de ceder sustancias indeseables, se cedan sustancias benéficas (Gómez-Estaca et al., 2010).

Las sustancias incorporadas intencionalmente, ya sea en la matriz polimérica o de forma independiente en el envase, son las responsables del efecto positivo en la conservación de las características definidas en el alimento durante su vida de anaquel (Gómez-Estaca et al., 2010). La liberación del compuesto activo es dependiente de factores como: la composición del polímero, la cristalinidad, la masa molar, la relación de superficie a volumen y el entorno donde se libera (Auras et al., 2004).

Las sustancias que se incorporan en los envases activos pueden ser:

- Reguladores de humedad.
- Reguladores de dióxido de carbono mediante la absorción de etileno y absorción de aromas.
- Incorporación de agentes antimicrobianos.
- Adición de antioxidantes, vitaminas, saborizantes y colorantes.

Estos compuestos activos están dirigidos a la protección de los compuestos sensibles a ser alterados por reacciones químicas indeseables (oxidación) durante la vida de anaquel y son clave en la calidad y caducidad de éste (Lupano, 2013).

#### 1.2.5 Películas y recubrimientos comestibles

Las *películas comestibles* se definen como una capa delgada de material que se puede consumir y proporcionar una barrera a la humedad, el oxígeno y el movimiento de solutos para los alimentos (Bourtoom, 2008). Las películas comestibles se pueden formar como recubrimientos de alimentos y películas independientes (Kester y Fennema, 1986), es decir, la forma de aplicación es lo que diferencia los términos “película” y “recubrimiento”. Una película es una matriz preformada, obtenida por moldeo, cuyo espesor es mayor al de los recubrimientos comestibles. Un *recubrimiento comestible* se define como una matriz transparente continua y delgada, que se estructura alrededor de un alimento generalmente mediante la inmersión de éste, en una solución formadora del recubrimiento (Del Valle et al., 2005).

En la formación de las películas se involucran diferentes tipos de enlaces (iónico, covalente, puentes de hidrógeno, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals) entre las cadenas del polímero, formando una red semi-rígida que atrapa e inmoviliza al solvente. A nivel molecular, intervienen dos tipos de fuerzas, la *fuerza de adhesión* que actúa entre las moléculas del polímero y la *fuerza de adhesión* que se ejerce entre la película y el soporte en donde se está formando (Ávila-Sosa y López-Malo, 2008).

Las técnicas para darle la forma final a las películas y recubrimientos incluyen la eliminación de solvente la cual se utiliza para producir películas de hidrocoloides; la segunda

es la gelación térmica donde se aplica un tratamiento térmico que permite la formación de un gel estable y por último la solidificación, las macromoléculas son disueltas en un disolvente junto con el plastificante que se homogeneizan y al final se vierte en un molde para obtener una capa final durante el secado (Cagri et al., 2004).

Los componentes para obtener películas y recubrimientos se pueden dividir en tres grupos: hidrocoloides (proteínas y polisacáridos), lípidos (ceras y ácidos grasos) y mezcla de ambos que se denominan como *composites* (Barbosa-Cánovas, 2012).

*Polisacáridos:* Las películas y recubrimientos a base de polisacáridos son hidrofílicos por lo que proporciona pobres propiedades de barrera a gases y al vapor de agua. Sin embargo, pueden actuar como agentes que retrasen la pérdida de humedad de los productos alimenticios (Kester y Fennema, 1986). Entre los polisacáridos utilizados en la fabricación de películas y recubrimientos comestibles se incluyen la celulosa, el almidón, la pectina, los extractos de algas marinas, el quitosano, entre otros (Krochta y Mulder-Johnson, 1997).

*Proteínas:* Por su carácter hidrofílico, debido a la presencia de grupos funcionales polares en su composición, las hace apropiadas para su aplicación en productos con superficie hidrofílicas, proporcionan buenas propiedades de barrera frente a gases permeantes ( $O_2$  y  $CO_2$ ), pero no frente al vapor de agua (Gennadios y Weller, 1990; Baldwin et al., 1995). De manera similar a las películas de polisacáridos, las películas de proteínas exhiben valores de permeabilidad al vapor de agua relativamente altos. Esto se le atribuye a la hidrofobicidad inherente a las sustancias de las proteínas y a las cantidades significativas de plastificantes hidrofílicos, como la glicerina y el sorbitol, que son incorporados en las películas para impartir una flexibilidad adecuada (Gennadios et al., 1997). Las proteínas que se utilizan para la formulación de películas son las proteínas de origen vegetal (soya, gluten de trigo y zeína de maíz) y las proteínas de origen animal (proteínas lácteas, colágeno y la queratina) (Chiralt et al., 2012).

*Lípidos:* Se ha demostrado que los recubrimientos de cera son sustancialmente más resistentes al transporte de humedad, sin embargo, los recubrimientos a base de ceras, así como a base de grasas y aceites, presentan ciertos problemas organolépticos (sabor ceroso y rancidez) (Guilbert, 1986; Gennandios et al., 1997). Las ceras se han empleado tradicionalmente para aportar brillo a frutas y hortalizas, así como para reducir la humedad y

la tasa de respiración, sin embargo, actualmente se están utilizando otras sustancias lipídicas que gozan de una mayor aceptación por parte del consumidor, como son los ácidos grasos omega 6 (ácido linoleico) y omega 3 (ácido linolénico) (Fernández et al., 2006). Los lípidos más comunes empleados son las ceras (de abeja, candelilla, carnauba, etc.) y los triacilglicéridos, monoglicéridos acetilados, alcoholes grasos y sucroésteres de ácidos grasos (Chiralt et al, 2012).

#### 1.2.5.1 Aditivos

Los aditivos son sustancias que se incorporan en los envases activos o películas basadas en biopolímeros con el objetivo de mejorar las propiedades estructurales los cuales modifican su funcionalidad y aplicación a los alimentos (Silva-Weiss et al., 2013).

*Conservadores:* La incorporación de conservadores en los envases activos o películas basadas en biopolímeros tiene la función de alargar la vida útil de los productos que están conteniendo. Estas sustancias pueden controlar el crecimiento de bacterias y hongos, debido a que el conservante se difunde hacia el alimento. Las sustancias comúnmente utilizadas como conservantes se encuentran el benzoato de sodio, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido propiónico y sorbato de potasio (Baldwin et al., 1995).

*Plastificantes:* Los plastificantes son compuestos no volátiles de bajo peso molecular que mejora la flexibilidad y la capacidad de proceso de los polímeros al reducir la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), estas sustancias reducen la tensión de deformación, dureza, densidad, viscosidad y carga electrostática de un polímero, al mismo tiempo que aumenta la flexibilidad de las cadenas del polímero, la resistencia a la fractura y la constante dieléctrica, también afecta en otras propiedades, como el grado de cristalinidad, la claridad óptica, la conductividad eléctrica, la resistencia a la degradación biológica, entre otras propiedades físicas (Vieira et al., 2011).

El bajo peso molecular y tamaño hidrodinámico de las moléculas de un plastificante le permite ocupar espacios intermoleculares entre las cadenas de polímeros, reduciendo las fuerzas secundarias entre ellas aumentando el volumen libre y, por lo tanto, en la movilidad molecular (Wypych, 2004; Vieira et al., 2011). La selección del tipo de plastificante se basa principalmente en la compatibilidad entre los componentes; la cantidad requerida; las

características de procesamiento, las propiedades mecánicas deseadas, entre otras propiedades (Cheng et al., 2006; Cao et al., 2009).

En la elaboración de películas y recubrimientos a base de biopolímeros, los plastificantes son aditivos esenciales, el aumento de la flexibilidad de las películas por la presencia de estos compuestos evita la formación de poros y grietas mejorando la integridad de la matriz polimérica (García et al., 2006).

En los biopolímeros el principal solvente es el agua, sus moléculas son capaces de reducir la temperatura y aumentar el volumen libre de los biomateriales, por lo tanto, es considerado como un plastificante. En películas a base de hidrocoloides, el agua es considerado el mejor plastificante natural. Además del agua, los plastificantes más utilizados son los polioles, mono, di y oligosacáridos (Vieira et al., 2011). Diversos autores mencionan que el glicerol es el plastificante que se ha incorporado en la mayoría de las películas a base de hidrocoloides, al ser una molécula altamente higroscópica previene la fragilidad de las películas formadas (Cuq et al., 1997; Rhim, 2004; Phan et al., 2009).

*Compuestos antimicrobianos:* El uso de películas y recubrimientos comestibles que contienen antimicrobianos ha demostrado ser una herramienta útil para proteger los alimentos contra el crecimiento de patógenos. Las sustancias con actividad antimicrobiana utilizados son los ácidos orgánicos, quitosano, nisina y algunos extractos y aceites esenciales de plantas. Para la selección de un antimicrobiano, se debe considerar la efectividad contra el microorganismo específico y las posibles interacciones entre el antimicrobiano, el biopolímero y los componentes alimenticios (Campos et al., 2010). Muchos compuestos antimicrobianos se han propuesto para la adición en la formulación de películas y recubrimientos comestibles, sin embargo, existe una tendencia de seleccionar los antimicrobianos de fuentes naturales y usar compuestos reconocidos como seguros (GRAS) (Devlieghere et al., 2004).

Los extractos y aceites esenciales de plantas son ricos en compuestos fenólicos, como flavonoides y ácidos fenólicos. Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos obtenidos de material vegetal que contienen componentes volátiles y no volátiles (carotenoides, esteroides, alcaloides, antocianinas y glicósidos), los cuales se pueden obtener por medio de una destilación alcohólica (Burt, 2004; Silva-Weiss et al., 2013). Los aceites

esenciales que contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos como carvacrol, eugenol y timol se consideran sustancias antimicrobianas efectivas, el modo de acción de estos compuestos es la alteración de la membrana citoplasmática, que interrumpe la fuerza motriz del protón, el flujo de electrones, el transporte activo y/o la coagulación del contenido celular (Seydim y Sarikus, 2006).

Diversos autores han incorporado componentes antimicrobianos en películas a base de biopolímeros con diferentes resultados. Kristo et al. (2008) adiciona lactato de sodio (entre 10 a 40% p/p) a películas de caseinato de sodio en contra de *L. monocytogenes* ligeramente; se han logrado inhibir *E. coli* O157H7 y *S. enterica* en películas de suero de la leche incorporando lacto peroxidasas (Min et al., 2005). En películas basadas en polisacáridos se han reportado estudios con almidón de tapioca, nisina contra *L. innocua* (Sanjurjo et al., 2006); quitosano, aceite esencial de tomillo, clavo y canela en *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *P. aeruginosa* (Hosseini et al., 2009); composites de quitosano, carboximetil celulosa o caseína adicionado con oleorresinas de romero, orégano, ajo para la inhibición de *L. monocytogenes* (Ponce et al., 2008).

Adición de antioxidantes en envases activos: Los antioxidantes comprenden sustancias que pueden proteger a los materiales (no solo alimentos) de la autooxidación independientemente del mecanismo de acción (Pokorny, 2007a). Estos compuestos pueden ser clasificados como antioxidantes primarios o secundarios, dependiendo del mecanismo de acción. Algunos antioxidantes presentan más de un mecanismo de acción, por lo que se refieren como antioxidantes de función-múltiple (Eça et al., 2014).

Los antioxidantes primarios son aceptadores de radicales libres que retrasan o inhiben el paso de inicio de la autooxidación o interrumpen el paso de propagación de la autooxidación. Por otra parte, los antioxidantes secundarios, reducen la velocidad de oxidación a través de numerosos mecanismos, pero no pueden convertir los radicales libres en productos más estables (Reische et al., 2002).

Los antioxidantes pueden ser naturales o sintéticos. Los antioxidantes sintéticos que han recibido aprobación para su uso en alimentos son el hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG), galacto de octilo, galacto de dodecilo, etoxiquina, palmitato de ascorbilo e hidroquinina butil terciaria (TBHQ) (André et al., 2010).

Los tocoferoles, tocotrienoles, ácido ascórbico, ácido cítrico, carotenoides y antioxidantes enzimáticos son antioxidantes naturales comúnmente agregados a los alimentos (Finley et al., 2011).

Los antioxidantes naturales presentan algunos inconvenientes (menor actividad antioxidante en comparación de los antioxidantes sintéticos y la presencia de otras sustancias que pueden afectar negativamente las propiedades sensoriales del producto), aunque ofrecen muchas ventajas, incluido el hecho de que los consumidores lo aceptan fácilmente (Pokorny, 2007b).

La actividad cuantitativa *in vitro* de un antioxidante puede depender del pH, el disolvente, los niveles de oxidación y las condiciones de reacción (Frankel y Finley, 2008). La evaluación de la captación de radicales libres de una sustancia es un método importante para determinar su actividad antioxidante (Pokorny, 2007). Entre los métodos que detectan la eliminación de electrones o radicales libres se encuentra el ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), el ensayo ABTS (2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y el ensayo FRAP (poder antioxidante reductor de fierro) (Berger et al., 2011). El ensayo DPPH es un método simple y altamente sensible. El DPPH consiste en un radical libre de nitrógeno, para generar su forma no radical (DPPH-H), se necesita un eliminador de radicales de protones, como un donador de hidrógeno. El ensayo ABTS, es aplicable en fases tanto acuosas como lipídicas, la decoloración del ABTS proporciona información sobre la actividad antioxidante de los productos naturales, la decoloración se puede medir sobre la base de la reducción del catión radical, como el porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm. Por último, el ensayo FRAP, proporciona resultados rápidos y reproducibles, proporciona la capacidad antioxidante de la muestra sobre la base de la reducción de iones férrico a iones ferrosos (Moon y Shibamoto, 2009).

#### 1.2.6 Mecanismos de formación de las películas

Para la formación de películas se deben comprender las propiedades químicas y la estructura de los biopolímeros y los aditivos que se usarán, es importante seleccionar el tipo de disolvente para la fundición húmeda o la mezcla de agentes activos, así como las características químicas de los plastificantes para verificar su compatibilidad con los biopolímeros (Han, 2014).

Una película comestible es esencialmente una red polimérica que interactúa ampliamente de una estructura de gel tridimensional, los materiales formadores de película deben formar una estructura de gel reordenada espacialmente con todos los agentes formadores de película incorporados (biopolímeros, plastificantes, otros aditivos) (Han, 2014). La solución formadora se extiende sobre la superficie del sustrato (en caso de un recubrimiento) o en una superficie de formación y, a medida que el solvente se evapora, las cadenas del polímero se interpenetran, pasando de un estado gel a formar la película con un secado adicional (Felton, 2013). El secado adicional de los hidrogeles elimina el exceso de solvente de la estructura del gel, la evaporación del solvente depende de varios factores, las cuales son, la temperatura, la presión atmosférica, el movimiento del aire y la humedad relativa. Estos factores pueden afectar en la formación de las películas, por ejemplo, si el solvente se evapora muy lentamente, los sustratos se humedecen y pueden comenzar a disolverse; por el contrario, si un disolvente se evapora rápido, las gotas que contiene polímeros pueden secarse antes de incidir sobre la superficie (Felton, 2013; Han, 2014).

Un parámetro muy importante que se debe tener en cuenta en las soluciones poliméricas acuosas es la viscosidad, a medida que aumenta la concentración del polímero, aumenta la viscosidad de la solución, esto depende de igual manera del peso molecular del polímero (a mayor peso molecular se exhiben viscosidades más altas). La viscosidad influye en la dispersión de las gotas, las soluciones más viscosas no pueden propagarse fácilmente a través de la superficie del sustrato antes de que se produzca la evaporación del disolvente (Felton, 2013).

La cohesión y la adhesión son parámetros físicos presentes en la formación de películas y recubrimientos comestibles, la cohesión es la fuerza de atracción entre las moléculas de la misma sustancia, este parámetro está relacionado en la resistencia mecánica de las películas (Guilbert et al., 1996). Si los ingredientes son heterogéneos, es decir, que no son compatibles con los biopolímeros, la cohesión de los materiales formadores de la película disminuye y la resistencia se debilita (Han, 2014). La adhesión es importante para los procesos de aplicación de los recubrimientos (Peyron, 1991; Guilbert et al., 1996). La adhesión es la fuerza de atracción de las moléculas de la superficie de diferentes sustancias y las superficies de los alimentos o material de formación, una fuerza de adhesión baja da como resultado

revestimientos incompletos en la superficie o desprendimiento fácil de las capas de revestimiento (Han, 2014).

### 1.2.7 Quitosano

El quitosano es un copolímero lineal de la D-glucosamina y el N-acetil-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, se obtiene de la desacetilación de la quitina glucosa (Shahidi et al., 1999). El término quitosano describe a grupos heterogéneos de polímeros diferenciados en peso molecular, viscosidad, pKa, etc. El quitosano es estructuralmente similar a la celulosa, la única diferencia es que el grupo hidroxilo del segundo átomo de carbono es sustituido por un grupo acetamina (No et al., 2007). El quitosano es obtenido por alcalinización parcial, es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa y se encuentra distribuido en la naturaleza, en los exoesqueletos de los crustáceos e insectos.

Cada lote de quitosano producido por el mismo fabricante puede diferir en su calidad, el grado de desacetilación y el peso molecular son parámetros que influyen en las propiedades del quitosano, el quitosano comercial contiene un grado de desacetilación entre 70-95% (Bof et al., 2015). Para un control de calidad adecuado en la producción de quitosano, existe una necesidad crítica de establecer métodos analíticos menos costosos y confiables, especialmente para la evaluación del peso y el grado de desacetilación. Además, la producción tradicional de quitosano implica desproteinización, desmineralización, decoloración y desacetilación. Las características fisicoquímicas del quitosano pueden verse afectadas por los métodos de producción y las especies de crustáceos. Cualquier modificación de estas metodologías podría afectar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del quitosano (viscosidad, grado de desacetilación, hidrofobicidad, capacidad de absorción de agua y grasa) y, por lo tanto, influir en la capacidad efectiva del quitosano como agente antimicrobiano (No et al., 2007).

Se ha demostrado que el quitosano es una sustancia no tóxica, biodegradable, biocompatible e insoluble en agua, pero soluble en solventes acidificados (Rodríguez-Núñez et al., 2014). En soluciones ácidas, los grupos aminos de las moléculas de quitosano son protonados a  $\text{NH}^{3+}$  adquiriendo cargas positivas (Ye et al., 2008) lo que permite interacciones

electrostáticas con grupos aniónicos en un entorno ácido (Xu et al., 2005). Debido a esta propiedad de formación de película, el quitosano es un material para producir envases de alimentos, especialmente como películas y recubrimientos comestibles (Rivero et al., 2009).

#### 1.2.7.1 Actividad antimicrobiana y antifúngica del quitosano

El quitosano es un polisacárido de alto peso molecular que exhibe actividad antimicrobiana y antifúngica (Campos et al., 2010). El mecanismo de acción de la actividad antimicrobiana del quitosano aún no se ha dilucidado completamente, pero se han propuesto varias hipótesis, la más aceptada explica que es debido a un cambio en la permeabilidad celular por las interacciones entre las moléculas de quitosano con carga positiva y las membranas celulares microbianas con carga negativa (No et al., 2007). Otro mecanismo propuesto es la unión del quitosano con el ADN microbiano, lo que conduce a la inhibición del ARNm y la síntesis de proteínas a través de la penetración del quitosano en los núcleos de los microorganismos. Las moléculas de quitosano pueden atravesar la pared celular bacteriana, compuesta de múltiples capas de mureína reticulada, y llegar a la membrana plasmática (Goy et al., 2009).

El tercer mecanismo es la quelación de metales y la unión de nutrientes esenciales al crecimiento microbiano (Roller y Covil, 1999). El quitosano tiene excelentes capacidades de unión a los metales donde los grupos amino en las moléculas de quitosano son responsables de la absorción de cationes metálicos por quelación (Helander et al., 2001). En este mecanismo, la eficiencia es mayor cuando el pH es alto, en donde los iones positivos se unen al quitosano, ya que los grupos amina no están protonados y el par de electrones en el nitrógeno de la amina están disponible para la donación de iones metálicos (Goy et al., 2009).

Diversos autores han estudiado el efecto del quitosano en la inhibición de bacterias, se han logrado inhibir la concentración de *E. coli*, *L. Plantarum* y *P. pentosauceus* usando quitosano en medio líquido (Darmadji y Izumimoto, (1994)). Se han estudiado el efecto antimicrobiano de derivados de quitosano inhibiendo significativamente la concentración de *E. coli*, *V. vulnificus*, *Shigella sonnei*, *S. typhi* y *S. enteritidis* y *S. aureus* (Papineau et al., 1991; Park et al., 2013).

En el caso de la actividad antifúngica, los oligómeros del quitosano se difunden dentro de las hifas, interfiriendo en la actividad enzimática responsable del crecimiento del hongo. La intensidad de la acción de degradación del quitosano en las paredes celulares fúngicas depende de la concentración y el pH (Goy et al., 2009).

#### 1.7.8 *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera* es la especie más conocida del género *Moringa*. Es un árbol originario del sur del Himalaya, el noreste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán. El rango de alturas del árbol es de 5 a 10 m (Anwar et al., 2007; Sánchez-Peña et al., 2013). Una característica importante de la *Moringa* es su capacidad de resistencia a la sequía y ser un árbol cultivable en zonas áridas y semiáridas (Sánchez-Peña et al., 2013). Diversas partes de la planta se han utilizado como producto alimenticio (Anwar et al., 2007). Las hojas de *Moringa* son fuente de  $\beta$ -carotenos, proteínas, vitamina C, calcio y potasio, así como fuente de antioxidantes como los son flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides (Dillar y German, 2000; Siddhuraju y Becker, 2003). Se han encontrado en la planta de *Moringa* todos los aminoácidos esenciales. En la Tabla 1, se representa el contenido de aminoácidos presentes en las hojas de *Moringa*.

Tabla 1. Contenido de aminoácidos presentes en las hojas de *Moringa*

Aminoácido	Hoja fresca	Hoja seca
Arginina	406.6	1 325
Histidina	149.8	613
Isoleucina	299.6	825
Leucina	492.2	1 950
Lisina	342.4	1 325
Metionina	117.7	350
Fenilalanina	310.3	1 388
Treonina	117.7	1 188
Triptófano	107	425
Valina	374.5	1 063

Fuente: Sánchez-Peña et al., (2013).

En las hojas de Moringa están presentes muchas vitaminas como la vitamina A, vitamina C, vitamina B, ácido fólico además de abundantes minerales como el hierro, zinc, calcio, potasio y cantidades relativamente altos de carotenoides (Liu et al., 2018). Las flores de Moringa son fuente de proteínas, calcio, potasio, antioxidantes (tocoferoles) y ácidos grasos poliinsaturados (Pontual et al., 2012; Liu et al., 2018).

Varios estudios han reportado la presencia e importancia de compuestos fenólicos de diferentes tejidos de Moringa (Saucedo-Pompa et al., 2018). Los principales compuestos fenólicos presentes en las hojas incluyen cinco lignanos, 26 flavonoides (quercetina, kaempferol, apigenina, luteolina y glucósidos de miricetina), 11 ácidos fenólicos y sus derivados (cafeoilquinico, ácidos feruloilquímicos y cumaroilquímicos y sus isómeros) (Rodríguez-Pérez et al., 2015; Castro-López et al., 2017). Los flavonoides son los metabolitos secundarios principales en las plantas de Moringa (Saucedo-Pompa et al., 2018).

#### 1.2.8 Películas de quitosano incorporado con antioxidantes

El quitosano actúa como empaque activo de alimentos para mantener las cualidades de los alimentos, sin embargo, la incorporación de compuestos antioxidantes se ha vuelto cada vez más popular debido a que mejorarán las propiedades funcionales y físicas de las películas de quitosano (Siripatrawan, 2016). Los compuestos con actividad antioxidantes que se pueden incorporar en las películas de quitosano, pueden ser de origen natural (extractos o aceites esenciales) o sintéticos.

Bajić et al. (2019) incorporaron extractos de roble (*Quercus robur*), lúpulo (*Humulus lupulus*) y algas pardas (*Laminaria hyperborea*) en películas de quitosano, los resultados indicaron que la adición de estos extractos vegetales mostró tendencias ascendentes en el contenido de humedad y en el porcentaje de elongación, sin embargo, los valores de tensión a la ruptura y el módulo de elongación exhibieron una disminución significativa. El contenido máximo de compuestos fenólicos totales fue de 9.1 mg EAG/g de película.

La incorporación de extracto etanólico de pequi (*Caryocar brasiliense* Comb.), presentaron interacciones entre los compuestos fenólicos en el extracto y los grupos hidroxilo

y amino presentes en el quitosano, estas interacciones se logaron observar mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. La permeabilidad de las películas disminuyó al igual que la cristalinidad por la presencia de los extractos (Breda et al., 2017). Las películas con extracto de bayas de maqui (*Aristotelia chilensis*) exhibieron propiedades antioxidantes y se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides totales, siendo las películas con 1% de extracto las películas que presentaron mayor cantidad con 8.44 mg EAG/g y 24.13 mg ER/g de película, respectivamente (Genskowsky et al., 2015).

El té verde (*Camellia sinensis*) es una buena fuente de compuestos fenólicos, incluidos la catequina, epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequina galato, entre otros. Siripatrawan y Harte (2010) prepararon y caracterizaron películas de quitosano incorporadas con té verde. Como plastificante se utilizó glicerol y las concentraciones finales de té verde fueron 0, 5, 10 y 20% p/v. Los espectros de FTIR indicaron cambios de absorción debido a las interacciones de los compuestos fenólicos del té verde con los grupos hidroxilo y amino en la matriz de quitosano.

Rambabu et al. (2018) prepararon películas activas con extracto de hojas de mango, los resultados indicaron que la adición de los extractos aumentó el espesor y el contenido de humedad disminuyó. En las propiedades de barrera, las películas con extracto exhibieron una reducción hidrofílica y a la permeabilidad al vapor de agua. Las propiedades mecánicas existieron un aumento a la resistencia a la ruptura en comparación de las películas de quitosano puro. Por último, la evaluación de la actividad antioxidante en términos del contenido de fenoles totales, la actividad radical por los métodos ABTS y DPPH, al igual del poder reductor férrico, presentaron resultados significativos con la adición del extracto de hojas de mango.

Se han desarrollado películas compuestas de quitosano incorporadas con aceite esencial de canela, la microscopia de escaneo láser confocal comprobó la retención del (Xu et al., 2019).

### 1.3 Hipótesis

La incorporación del plastificante y de los extractos de *Moringa oleifera* mejorará las propiedades de las películas a base de quitosano.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Caracterizar películas activas de quitosano plastificadas con glicerol e incorporando extracto de Moringa (*Moringa oleifera*) como fuente de antioxidantes para su uso como material de envase.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las harinas de hojas y flores de *Moringa oleifera* con relación a al análisis proximal y los compuestos bioactivos.
- Evaluar el efecto de la adición de glicerol y extracto de *Moringa oleifera* sobre las propiedades activas, físicas y mecánicas de las películas de quitosano.
- Evaluar el efecto de la adición de glicerol y extracto de *Moringa oleifera* sobre las propiedades de barrera, morfológicas y estructurales de las películas de quitosano.

## Capítulo 2

### 2.1 Metodología

#### 2.1.1 Estrategia de trabajo

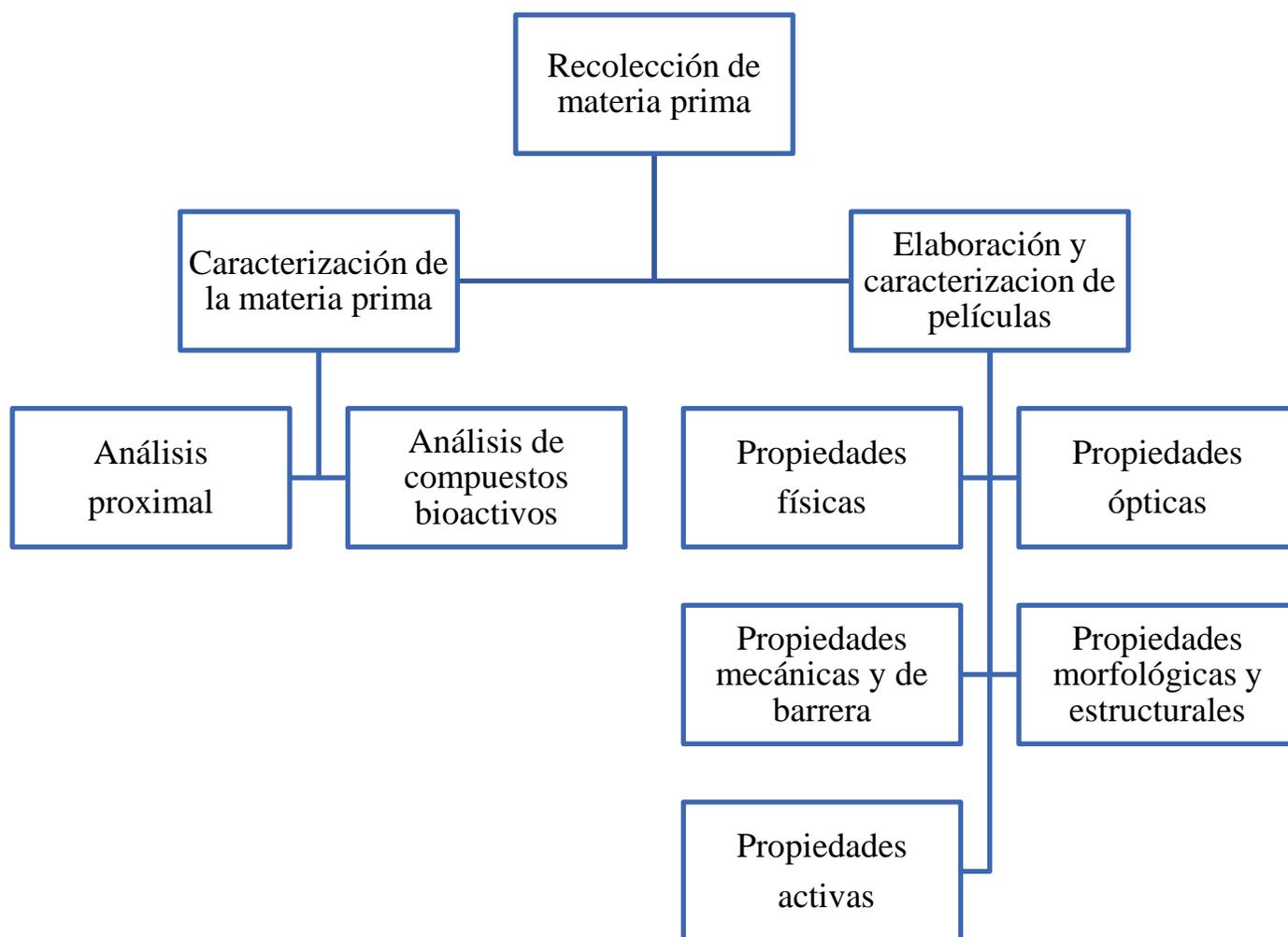


Figura 1. Estrategia de trabajo

### 2.1.2 Recolección de la materia prima

Las hojas y flores de *Moringa oleifera* se recolectaron en la ciudad de Mérida, Yucatán, México, de manera aleatoria en diferentes puntos de la ciudad. Las hojas y flores de Moringa se separaron de los tallos y se secaron en una temperatura de 50 °C por 24 h. Transcurrido ese tiempo, las hojas y flores se trituraron en una licuadora comercial hasta tener un polvo fino. A las harinas se le realizaron análisis proximales y cuantificación de compuestos bioactivos.

### 2.2 Análisis proximal de las hojas y flores de *Moringa oleifera*

Los métodos de la AOAC, 1990 (Association of Official Analytical Chemists) fueron usados para determinar el contenido de humedad, cenizas, fibra cruda, proteína y extracto etéreo (grasas). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Los valores proximales fueron reportados en porcentaje.

Para determinar el contenido de humedad de las muestras de Moringa (hojas y flores), se pesaron 5 g de harina y se secó en un horno a 105 °C, hasta obtener un peso constante. La determinación del contenido de cenizas se realizó incinerando a 550 °C durante aproximadamente 4 h. El método Kjeldahl se usó para determinar el contenido de proteínas por multiplicación del nitrógeno con el factor de conversión (6.25). El contenido de fibra cruda de las muestras fue determinado por digestión y el extracto etéreo (grasas) se realizó por el método Soxhlet. El contenido del extracto libre de Nitrógeno (ELN) se determinó por diferencia de la suma de toda la composición proximal.

### 2.3 Análisis de compuestos bioactivos

#### 2.3.1 Contenido de fenoles totales

La concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría por el método de Folin-Ciocalteu, que se fundamenta en su carácter reductor. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácido fosfowolfrámico y fosfomolibdúico en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia de color azul desarrollado se mide a 765 nm (Kuskoski, 2005).

Este procedimiento se realizó por la metodología propuesta por Singleton y Rossi, (1965) con algunas modificaciones. Se determinó el contenido de fenoles totales tomando 100  $\mu$ L del extracto fenólico con 2 mL de agua destilada y 100  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu (2 N), después de 5 min de equilibrio, se agregaron 300  $\mu$ L de carbonato de sodio al 20 % dejando reposar por media hora a una temperatura de 40 °C.

Se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 765 nm con un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda. La concentración de los fenoles totales fue calculada usando una curva estándar de ácido gálico (0-10 mg/mL) y los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100 g de muestra seca.

### 2.3.2 Contenido de vitamina C

La determinación de vitamina C se realizó por volumetría de óxido-reducción. Se utilizó como agente valorante una solución de 2,6-diclorofenolindofenol, previamente estandarizada (Zago et al., 2010). La normalización de la solución de 2,6-diclorofenolindofenol se realizó utilizando una solución patrón de ácido ascórbico, preparada con 50 mg de ácido ascórbico aforados en 50 mL de una solución de ácido oxálico 1 % p/v, de esta solución preparada se tomaron 2 mL y se aforaron con 40 mL de una solución de ácido oxálico 1 %. La estandarización se llevó a cabo tomando los 40 mL de la solución patrón de Vitamina C y titulándolo con la solución de 2,6-diclorofenolindofenol, hasta que un color ligeramente rosado persistiera por 20 s.

Se pesó 1 g de harina en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, se añadió 25 mL de solución de ácido oxálico 1 % p/v y se tituló con la solución de 2,6 diclorofenolindofenol. Los resultados se expresan como mg de vitamina C/ 100 g de muestra seca.

### 2.3.3 Contenido de flavonoides totales

Se aplicó el método propuesto por Arvouet-Grand et al. (1994), el cual se basa en una reacción colorimétrica entre los flavonoides y el tricloruro de aluminio cuyo producto es un compuesto colorido que tiene un máximo de absorción a 420 nm.

El extracto de flavonoides se preparó macerando 5 g de harina en 95 mL de metanol con agitación durante 3 h en obscuridad, transcurrido este tiempo se filtró a vacío y se tomaron una alícuota de 1 mL la cual se afora a 10 mL con metanol. De esta nueva solución, se reaccionó 1 mL de muestra con cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) durante 10 min y se mide la absorbancia a 420 nm.

Para la cuantificación de los flavonoides totales se realizó una curva de calibración con soluciones de concentración conocida de quercetina (5-50 ppm) para obtener la ecuación de la recta. El resultado se expresó como mg equivalentes de quercetina (EQ)/100 g de muestra seca.

#### 2.3.4 Contenido de $\beta$ -carotenos

Se determinó espectrofotométricamente mediante la extracción de los  $\beta$ -carotenos con hexano y alcohol isopropílico utilizando la metodología propuesta por Perez-Vendrell et al. (2001). Se homogenizaron 5 g de harina en 12.5 mL de metanol-acetona (1:1) con agitación constante, el extracto se filtró y se le adicionó 40 mL de éter etílico y posteriormente se hacen 3 lavados de 30 mL c/u de solución de NaCl al 10% en un embudo de separación para la fase acuosa. La fase obtenida (fase etérea) se filtró con 7 g de sulfato de sodio anhidro y es aforado a 50 mL con éter etílico. Las muestras se leen a 450 nm. Se realizó una curva de calibración con  $\beta$ -caroteno estándar de 6 ppm. Los resultados se expresaron como mg de  $\beta$ -carotenos /100 g de muestra.

#### 2.4 Formulación de películas comestibles

##### 2.4.1 Obtención del extracto de *Moringa oleifera*

Se siguió la metodología de Nascimento et al. (2017) con algunas modificaciones. 5 g de harina de Moringa se maceraron en 100 mL de etanol-agua (80-20 v/v) con agitación durante 6 h continuas, transcurrido ese tiempo se almacenó a obscuridad a 4 °C durante 18 h, la suspensión se filtró y el sobrenadante resultante se concentró en un rotavapor a presión reducida a 55 °C.

#### 2.4.2 Sólidos totales del extracto de Moringa

Se realizó por medio de la norma NMX-F-527-1992, las cápsulas de porcelana fueron puestas a peso constante previamente. Se colocó 1 mL de extracto en las cápsulas de porcelana y se evaporó el solvente en una estufa a 60 °C durante 24 h, al término de esto, se pesó la cápsula con los sólidos. Por diferencia de peso se determinó la cantidad de sólidos totales presentes en el extracto.

#### 2.4.3 Obtención de películas comestibles

Se utilizó quitosano medio peso molecular (75-85 % desacetilación, Sigma-Aldrich, St. MO, EUA) y glicerol (Herschi-Trading, Mex). En la Tabla 2 se muestran las 9 formulaciones realizadas, las cuales se variaron en las concentraciones de Quitosano (Q), glicerol (G) y extracto de Moringa (E). Las películas se realizaron por la técnica de vaciado en placa. Las soluciones de quitosano se prepararon con ácido acético (Fermont, México) al 1 % v/v durante 6 h de agitación, transcurrido ese tiempo, se adicionó glicerol y el extracto de Moringa, la solución final se vació en cajas Petri y se secaron a 60 °C en una estufa durante 24 h. Las películas formadas se separaron de los moldes manualmente y se almacenaron en un desecador a obscuridad para evitar la ganancia de humedad. Las composiciones de las mezclas de quitosano/glicerol fueron 100/0, 80/20 y 60/40 en peso, y las concentraciones de extracto de *Moringa oleifera* que fueron 0, 0.07 y 0.15 g.

Tabla 2. Formulaciones de las películas

Formulación	Código
Quitosano (100%)	Q 100
Quitosano (100%), Extracto (0.07%)	Q-E 100:1
Quitosano (100%), Extracto (0.15%)	Q-E 100:2
Quitosano (80%), Glicerol (20%)	Q-G 80:20
Quitosano (80%), Glicerol (20%), Extracto (0.07%)	Q-G-E 80:20:1
Quitosano (80%), Glicerol (20%), Extracto (0.15%)	Q-G-E 80:20:2
Quitosano (60%), Glicerol (40%)	Q-G 60:40
Quitosano (60%), Glicerol (40%), Extracto (0.07%)	Q-G-E 60:40:1
Quitosano (60%), Glicerol (40%), Extracto (0.15%)	Q-G-E 60:40:2

## 2.5 Caracterización de las películas formuladas

### 2.5.1 Propiedades fisicoquímicas de las películas

#### 2.5.1.1 Espesor y densidad aparente

El espesor de cada película se midió en 6 puntos diferentes a temperatura ambiente con ayuda de un micrómetro (Mitotuyo, Japón), considerando la media de los valores como su espesor. Se determinó en una balanza analítica el peso de cada película con medidas de aproximadamente 2.0 cm<sup>2</sup> y se calculó el volumen de dicha muestra para hallar la densidad aparente.

#### 2.5.1.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad de las películas fue determinado por gravimetría, calculando la pérdida de peso al cabo de 24 h de secado. Se recortó un cuadrado de 2 cm<sup>2</sup> de película y se pesó en una balanza analítica, la muestra fue colocada en una estufa a 80 °C por 24 h. El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

### 2.5.1.3 Porcentaje de solubilidad

La solubilidad de las películas se determinó de acuerdo con la metodología de Gontard et al. (1994). Se usaron las películas con peso seco de la prueba de humedad. Las muestras a peso seco se sumergieron en 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se recuperó la película y se secaron las muestras en un horno a 80 °C por 24 h y se calculó el porcentaje de solubilidad con la siguiente fórmula y expresado como el porcentaje de materia seca de la película solubilizada en agua:

$$\% \text{ solubilidad} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

## 2.5.2 Propiedades ópticas

### 2.5.2.1 Transmisión de luz y opacidad

Las propiedades de barrera a la luz de las películas formuladas se determinaron de acuerdo con la metodología de Nouraddini et al. (2018). Los valores de transmisión de luz de las películas se obtuvieron de la medición de la transmitancia de las longitudes de onda seleccionadas entre 200 y 800 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 11, por lo cual se recortó un rectángulo de las películas de 40 mm x 10 mm y se colocaron en uno de los lados que pasa el haz de luz en una celda espectrofotométrica. Se usó el aire como blanco de calibración. La transmisión de luz de las películas se obtuvo directamente en el espectrofotómetro expresado en % de Transmitancia.

La opacidad fue determinada por la medida de la absorbancia a 600 nm con espectrofotómetro UV-Vis y calculada por la siguiente ecuación:

$$O = \frac{Abs\ 600}{\delta}$$

Donde O es la opacidad, Abs 600 es el valor de absorbancia a 600 nm y  $\delta$  es el espesor de la película (mm).

### 2.5.2.2 Color

Se obtuvieron los parámetros de las películas formuladas usando un colorímetro Minolta modelo CR 300 (Osaka, Japón) calibrado con un estándar (Y=93.2, x=0.3133, y=0.3192), se evaluaron las diferencias de parámetros en la escala del CIELab, luminosidad ( $L^*$ ) y los parámetros de cromacidad,  $a^*$  (rojo-verde) y  $b^*$  (amarillo-azul) y el ángulo de tono  $^\circ$ Hue. Las mediciones se realizaron en 6 puntos aleatorios de las películas. La diferencia total de color ( $\Delta E$ ) se tomó como referencia estándar las películas control (sin extracto) y la intensidad de color ( $C^*$ ) fueron calculados usando las siguientes ecuaciones:

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$$

$$\Delta E^* = [(L^* - L_0)^2 + (a^* - a_0)^2 + (b^* - b_0)^2]^{1/2}$$

Donde  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , representan los valores de parámetro de color del estándar y  $L_0$ ,  $a_0$  y  $b_0$  representan los parámetros de color de la muestra.

### 2.5.3 Propiedades mecánicas

#### 2.5.3.1 Resistencia a la tensión, porcentaje de elongación y módulo de elasticidad

La evaluación de las propiedades mecánicas de las películas se llevó a cabo de acuerdo con el método de la ASTM D882-95 con ayuda de una máquina de prueba universal Instron 4442. Las películas para analizar fueron cortadas en tiras de 60 x 10 mm y el grosor fue medido con un micrómetro digital (0.001 mm). Las muestras fueron colocadas en bases rectangulares con cinta adhesiva en los extremos para evitar el desgarre entre mordazas. Se utilizó una celda de carga de 25 kg con una separación de mordazas de 30 mm y una velocidad de deformación de 50 mm/min. La resistencia a la tensión, el porcentaje de elongación a la ruptura y el módulo de elasticidad fueron determinados hasta que la película se rompió. Se realizaron 6 mediciones por cada formulación.

Los resultados para calcular la resistencia a la tensión (RT), el porcentaje de elongación a la ruptura (%Er) y el módulo de elasticidad (ME) de las películas fueron obtenidos utilizando las siguientes ecuaciones:

$$RT = \frac{F_{max}}{At}$$

$$\%Er = \frac{Lf - Li}{Li} \times 100$$

$$ME = \frac{F}{At} \times \frac{1}{\epsilon}$$

Donde:

$F_{max}$ = fuerza máxima a la fractura (N)

$At$ = área transversal de la muestra (mm<sup>2</sup>)

$Lf$ = longitud final (mm)

$Li$ = longitud inicial (mm)

$F$ = fuerza correspondiente al esfuerzo

$\epsilon$ = elongación correspondiente al esfuerzo

#### 2.5.3.2 Determinación de la resistencia al rasgado

Se realizó el ensayo de acuerdo con la norma ASTM D1938, se cortaron tiras de películas de 20 x 60 mm haciendo un corte a la película de 30 mm, se colocaron las tiras en los extremos de las mordazas. Se utilizó una celda de carga de 25 kg con una separación de mordazas de 30 mm y una velocidad de deformación de 50 mm/min hasta tener la muestra completamente rasgada.

#### 2.5.4 Velocidad de Transmisión de Vapor de Agua (VTVA)

Se realizó mediante la norma de la ASTM E96 que evalúa la transferencia de vapor de agua a través de muestras semipermeables y permeables, se pesaron 250 g de sílica gel y se colocó dentro de un desecador. Se recortó la película prefabricada según el tamaño del contenedor y se selló para evitar la pérdida de vapor, excepto a través de la muestra de prueba, se le agregó 30 mL de agua destilada al recipiente dejando un pequeño espacio de aire entre la muestra y el agua. Se introdujo al desecador y se registró el peso cada 2 h. Para determinar la Velocidad de Transmisión de Vapor de Agua (VTVA) se dividió la pendiente de la recta entre el área de transferencia de la película (0.000285 m<sup>2</sup>).

$$VTVA = \frac{Pendiente}{A_{transferencia}} \left( \frac{g}{m^2h} \right)$$

### 2.5.5 Análisis morfológico

La superficie morfológica de las películas de quitosano, glicerol y extracto de *Moringa oleifera* fue caracterizado usando un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) Phillips XL 30 ESEM. Antes del análisis, las películas se montaron en un portamuestras cilíndrico de 10 mm de diámetro con cinta adhesiva de doble cara. La morfología de la superficie se observó en muestras de 10 x 10 mm a 3 magnificaciones que fueron 100X, 250X y 500X.

### 2.5.6 Propiedades estructurales

Los espectros IR de las películas formuladas con quitosano, glicerol y extracto de *Moringa oleifera* se obtuvieron usando un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (espectrofotómetro Nicolet 670). El rango de medición fue de 4,000 -650  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , una velocidad de escaneo de 0.475  $\text{cm}^{-1}\text{s}^{-1}$  y 100 escaneos. La técnica de reflectancia total atenuada se aplicó con un accesorio Avatar HATR multibounce con cristal de ZnSe a 45°

### 2.5.7 Propiedades activas

Para el análisis de las propiedades activas de las películas formuladas se analizaron el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS. Para la realización de estos análisis se requirió realizar una extracción a las películas las cuales se realizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Genskowsky et al. (2015) con modificaciones, se pesó 1 g de película a analizar, se colocaron en tubos de ensayo y se adicionaron 5 mL de metanol, se transfirió a un baño ultrasónico durante 25 min y se dejó en reposo por 24 h a oscuridad a 4 °C, la solución final se filtró para separar la parte sólida de la líquida y el líquido se resguardó para los análisis. Al extracto obtenido se le cuantificó Fenoles totales con la metodología descrita previamente.

#### 2.5.7.1 Actividad antioxidante por el método ABTS

El método ABTS se realizó con la metodología de Miller et al. (1993) el catión ABTS<sup>+</sup> se generó con la interacción de 19.2 mg de ABTS disuelto en 5 mL de agua destilada y 88 µL de persulfato de sodio 0.0378 g/mL. El catión fue incubado a obscuridad por 16 h. El radical activado fue diluido con etanol a una absorbancia de  $0.700 \pm 0.02$  a una longitud de onda de 734 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis PerkinElmer Lambda. Se diluyó 100 µL del extracto de películas con 3.9 mL de la solución ABTS y se midió la disminución de la absorbancia a los 6 min de reacción. Los resultados se expresaron como % de inhibición de radicales libres y en mg equivalentes de Trolox (ET)/ 100 g de película.

#### 2.5.7.2 Antioxidante por el método DPPH

Del método original (Brand-Williams et al., 1995) con modificaciones de Moo-Huchin et al. (2014), se preparó una solución DPPH mezclando 2.5 mg de radical DPPH con metanol. La solución fue ajustada a una absorbancia de  $0.700 \pm 0.02$  a una longitud de onda de 515 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis PerkinElmer Lambda.

3.9 mL de la solución DPPH se mezcló con 100 µL del extracto de películas y se midió la disminución de la absorbancia a los 30 min. Se utilizó metanol como blanco. Se realizó una curva de calibración con Trolox (0.01-0.15 mM/L) y los resultados se expresaron en % de inhibición de radicales libres y mg equivalentes de Trolox (ET)/ 100 g muestra seca.

#### 2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) por medio del paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión. El valor de significancia estadística de las diferencias entre los valores medios fue de  $p < 0.05$  y se aplicó la prueba de Duncan para todos los análisis estadísticos. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar.

## Capítulo 3

### Resultados y discusión

#### 3.1 Caracterización de la materia prima

##### 3.1.1 Análisis proximales.

Según la FAO, los análisis proximales son un esquema de análisis químico mediante el cual se determina la composición de un alimento en términos de sus principales grupos de nutrientes. El análisis proximal tiene limitaciones en cuanto a que no señala si el alimento contiene o no sustancias que puedan dañar al cuerpo humano, tampoco indica cuál es el contenido en vitaminas o la composición de la materia mineral, sin embargo, hoy en día se puede decir que el análisis proximal de un alimento es el punto de partida lógico en la evaluación de su contenido de nutrientes. Los resultados del análisis proximal están expresados en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de los análisis proximales de las flores y hojas de *Moringa oleifera*

Parámetro	Hojas	Flores
Humedad	4.64 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.08 <sup>b</sup>
Cenizas	3.43 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.77 ± 0.16 <sup>b</sup>
Extracto etéreo	25.82 ± 0.09 <sup>a</sup>	32.75 ± 1.58 <sup>b</sup>
Fibra cruda	9.61 ± 0.04 <sup>a</sup>	16.09 ± 0.83 <sup>b</sup>
Proteínas	22.04 ± 0.86 <sup>a</sup>	9.47 ± 0.66 <sup>b</sup>
ELN	34.47 ± 0.80 <sup>a</sup>	28.52 ± 1.85 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes por filas indican diferencia significativa con una  $p < 0.05$  por la prueba de Duncan.

El análisis de la composición proximal de las hojas y flores de *Moringa oleifera* presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en todos los análisis realizados. Los valores de contenido de humedad fueron mayores en las flores. Los valores de humedad en hojas son inferiores a los reportados por Arowosegbe (2019) y similares a los reportados en flores de *Moringa* (7.26 % en hojas y 8.97 % en flores). Debido a los valores relativamente bajos de humedad, las harinas de hojas y flores de *Moringa oleifera* se ubica dentro de la clasificación del *Codex Alimentarius* para harinas y polvos, en donde se colocan las harinas hasta un

máximo de 15 % de humedad, lo que le permite ser una opción como aditivo el uso de harina de moringa. Aunque es probable que la flor, sea más inestable y susceptible a la contaminación durante un almacenamiento prolongado (Arowosegbe, 2019).

El contenido de ceniza se refiere al residuo inorgánico que queda después de la ignición o la oxidación completa de la materia orgánica en una muestra de alimento, los residuos inorgánicos consisten principalmente en los minerales presentes en el alimento (Ismail, 2017). Se observa que las flores presentan mayor contenido de cenizas, al igual en el contenido de fibra cruda.

En cuanto a los porcentajes de grasa, las flores de Moringa presentan mayor cantidad de grasa que las hojas de Moringa. En fibra cruda las hojas son las que presentan mayor contenido con  $16.09 \pm 0.83$  %. Las variaciones del contenido de grasas de las dos partes de la planta depende de las condiciones en la que creció, cuando una planta u organismo recibe energía asimilable en exceso del alimento o de su actividad fotosintética, este puede almacenarlo en forma de grasas para la producción de energía, y a medida que la planta crece y comienza a producir semillas, algunos carbohidratos comienzan a convertirse en grasas y aceites más concentrados, aportando más energía que pueden ser almacenados (Arowosegbe, 2019).

El contenido de proteínas, las hojas presentaron mayor contenido. Se han reportado valores mayores del 20 % de proteína como los reportados por Mohammed et al. (2018) donde obtuvieron valores entre 24.47 y 30.05 % de proteína de hojas de Moringa en cuatro regiones de Sudán. Estas variaciones de contenido proteico en las hojas de moringa pueden deberse a las condiciones climatológicas y edafólicas en que son cultivadas las plantas de igual manera influyen la madurez fisiológica de los árboles y la fracción de la planta donde se obtienen las hojas y flores.

### 3.1.2 Análisis de compuestos bioactivos

Los fitoquímicos o compuestos bioactivos se definen como aquellos compuestos presentes en las plantas con propiedades antioxidantes y alimenticias, diferentes a las vitaminas y minerales, generalmente estos compuestos son de estructuras químicas complejas con varios anillos aromáticos. El énfasis que se le han dado al estudio de los compuestos bioactivos de plantas es por su capacidad de modular los procesos metabólicos, teniendo como resultando la promoción de una mejor salud (Foster et al., 2005).

Los resultados del análisis de compuestos bioactivo de las hojas y flores de *Moringa* se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados del análisis de compuestos bioactivos de las hojas y flores de *Moringa oleifera*

Parámetro	Hojas	Flores
Fenoles totales (mg EAG)	2,156.05 ± 97.43 <sup>a</sup>	1,860.13 ± 84.73 <sup>b</sup>
Ácido ascórbico (mg EAA)	190.00 ± 14.14 <sup>a</sup>	100.00 ± 14.14 <sup>b</sup>
Flavonoides (mg EQ)	154.66 ± 4.05 <sup>a</sup>	74.60 ± 3.38 <sup>b</sup>
Antocianinas (mg cianidina 3-glucósido)	70.64 ± 2.13 <sup>a</sup>	58.11 ± 2.83 <sup>b</sup>
Carotenoides (mg β-C)	85.10 ± 3.52 <sup>a</sup>	38.64 ± 2.08 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes por filas indican diferencia significativa con una  $p < 0.05$  por la prueba de Duncan.

Se observa que las hojas de *Moringa* presentaron cantidades mayores de compuestos bioactivos en comparación de las flores de moringa. El contenido de compuestos fenólicos totales de las hojas de *Moringa* de la presente investigación es similar a los reportados por Guzmán y Díaz (2017), quienes recolectaron hojas de *Moringa* en 20 zonas del estado de Chiapas, teniendo como valor mínimo 2,436.3 mg EAG/100 g y valor máximo de 3,749.9 mg EAG/100 g. Por otra parte, Castillo-López et al. (2017), cuantifican el contenido de compuestos fenólicos totales de hojas de *Moringa oleifera* recolectados en Culiacán, Sinaloa, México, utilizando metanol como disolvente de extracción, obteniendo 76.63 mg EAG/ g de muestra (7,663 mg EAG/ 100 g) concentraciones superiores comparados con los resultados del presente trabajo (2,156.048 ± 97.43 mg EAG/100 g). Las variaciones de las concentraciones de compuesto fenólicos totales no solamente a las las condiciones de crecimiento de las plantas, sino que, también se debe de considerar los métodos de extracción

que se someten las fracciones de la planta (Azmir et al., 2013). El método de extracción que se utilizó en la presente investigación fue la maceración y como solvente etanol al 80%, debido a que diversos autores mencionan que este método presenta ventajas en comparación a otros métodos de extracción por la simplicidad, conveniencia y economía al extraer la mayor cantidad de fenoles totales, flavonoides totales y su relación con la actividad antioxidante de la Moringa (Siddhuraju y Becker 2003; Vongskak et al., 2013; Nascimento et al., 2017).

Un grupo importante de compuestos fenólicos son los flavonoides, sustancias naturales del difenilpropano (C6-C5-C6) que no son sintetizados por los humanos, sino que se consumen regularmente en la dieta humana y son conocidos por sus efectos benéficos para la salud al presentar propiedades antioxidantes (Kefford y Chandler, 1960; Panche et al., 2016). Los resultados del contenido de flavonoides totales presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras de hojas y flores. La concentración de flavonoides totales de las flores equivale aproximadamente 50 % menos al de las hojas. Vats y Gupta (2017) evaluaron los compuestos bioactivos de extractos hidroetanólicos de *Moringa oleifera* de la región de Rajasthan, India, donde el mayor contenido de flavonoides totales se presentó en las flores con un valor de 3.5 mg EQ/g (350 mg EQ/100 g) y en hojas con 2.3 mg EQ/g (230 mg EQ/100 g), estos valores son superiores a los reportados en este trabajo. La mayoría de los flavonoides son solubles en agua, Sreelatha y Padma (2009), describen que las muestras extraídas con etanol o metanol contienen concentraciones más altas en comparación a las muestras tratadas con agua, por ejemplo, Arowosegbe (2019), cuantifica el contenido de flavonoides totales usando etanol como solvente de extracción y diferentes partes de *Moringa oleifera* recolectados de Ado-Ekiti, Nigeria, reportan que en las hojas de Moringa obtienen mayor cantidad de flavonoides con 26.29 mg EQ/g (2,629 mg EQ/100 g) y en las flores con un contenido total de 10.19 mg EQ/g (1,019 mg EQ/100 g).

M'Hiri et al. (2015) consideran que las diferencias en las concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides entre las muestras de *Moringa oleifera* pueden deberse al entorno de crecimiento, la variabilidad genética y el método de tratamiento de la muestra, aunque tanto el metanol como el etanol pueden extraer concentraciones más altas de flavonoides y compuestos fenólicos, el etanol se usa ampliamente como solvente efectivo

para la extracción de antioxidantes, debido a que el metanol representa un riesgo ambiental y es tóxico para el consumo humano.

El ácido ascórbico es un antioxidante dietético importante, presente en los fluidos extracelulares de las plantas, este compuesto neutraliza las especies reactivas de oxígeno (EROs) en fase acuosa antes del inicio de la peroxidación lipídica y también regenera el  $\alpha$ -tocoferol que a su vez inhibe el radical peroxilo y el oxígeno singlete (Percival, 1998). En el análisis del contenido de ácido ascórbico se encontró que en las hojas se obtiene mayor concentración. Se observa que el contenido de ácido ascórbico es mayor a las muestras de hojas de moringa reportado por Raghavendra et al., (2015) con un valor de 0.75 mg EAA/g (75 mg EAA/100 g). Vats y Gupta (2017), informaron un mayor contenido de ácido ascórbico tanto en hojas como en flores (280 mg EAA/100 g y 710 mg EAA/100 g, respectivamente).

En la composición de carotenoides se observan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las muestras de hojas y flores de Moringa, las hojas presentan mayor contenido de carotenos. El contenido de carotenoides en hojas, es similar a los reportados por Vázquez-León et al. (2017), donde estudian el contenido de compuestos bioactivos de hojas de *Moringa oleifera* cultivados en Veracruz, México y su efecto a diferentes factores climáticos, edad de árboles y parámetros de suelo. Estos autores mencionan que los árboles con 608 días de edad obtienen concentraciones de 86.49 mg  $\beta$ -C/100 g de hojas, estos valores son similares a los reportados en esta investigación, el rango de edades de los árboles estudiados por Vázquez-León et al. (2017) es de 309 a 949 días de edad, obteniendo un rango de concentraciones de carotenoides entre 51.41 a 137.30 mg  $\beta$ -C/100 g de hojas lo que se podría mencionar que las edades de los árboles están relacionados en la composición de los carotenoides en las plantas. Los carotenoides desempeñan funciones esenciales en el aparato fotosintético de las plantas, los carotenoides tiene la capacidad de apagar las moléculas triples y volver en su estado basal, también puede extinguir la energía de excitación del oxígeno en estado excitado simple y volverlo en su estado de triple normal y por último, los carotenoides protegen de la radiación excesiva, debido a su capacidad de extinguir o disipar la energía de excitación de otras moléculas como el calor para evitar daños a la célula vegetal (Ramel et al., 2013; Cao et al., 2015). Cuando se producen excesivas radiaciones solares y UV, se aumenta la síntesis de carotenoides en las hojas de Moringa que proporciona protección contra las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) generadas por el estrés causado por las

condiciones climáticas (Vázquez-León et al., 2017). Por ejemplo, Vats y Gupta (2017), recolectan muestras de diferentes partes del árbol de Moringa en mayo y reportan valores superiores de carotenoides en hojas y flores con concentraciones de 14.10 y 1.40 mg  $\beta$ -C/g (1,410 y 140 mg  $\beta$ -C/100 g), respectivamente.

Las antocianinas son los compuestos responsables del color azul, púrpura y rojo de las flores, frutos y hojas (Lu et al., 2015). La antocianina monomérica cambia reversiblemente de color con un cambio de pH y la diferencia en la absorbancia de los pigmentos es proporcional a la concentración de pigmento (Lee et al., 2005). Se observa que el mayor contenido de compuestos bioactivos se encuentra en las hojas y este comportamiento también sucede con el contenido de antocianinas, las hojas presentaron un contenido de  $85.1 \pm 3.52$  mg de cianidina -3 glucósido/100 g y las flores  $38.64 \pm 2.08$  cianidina -3 glucósido/100 g de muestra. Vats y Gupta (2017), mencionan que las flores de Moringa se presenta mayor contenido de antocianinas (40.90 mg cianidina 3-glucósido/ g) y una concentración menor en las hojas (9.40 mg cianidina 3-glucósido). Reimberg et al., (2009), indican que el contenido de compuestos bioactivos de las plantas, así como su actividad antioxidante no solamente está influenciado por los factores climáticos sino también por la composición del suelo. Vázquez-León et al., (2017) demostraron que existe una correlación positiva entre las edades de los árboles de moringa, los niveles de  $\text{NH}_4^{4+}$ , la materia orgánica y el fósforo con los carotenoides totales y la actividad radical de los extractos de hojas de Moringa.

### 3.2 Caracterización de las películas formuladas

#### 3.2.1 Características fisicoquímicas de las películas formuladas

Los resultados del espesor, densidad, porcentaje de humedad porcentaje de solubilidad se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de espesor, densidad, contenido de humedad y porcentaje de solubilidad

Formulación	Espesor (mm)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	% Humedad	% Solubilidad
Q 100	0.065 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.783 ± 0.064 <sup>a</sup>	13.444 ± 1.934 <sup>ab</sup>	19.917 ± 0.814 <sup>bcd</sup>
Q-E 100:1	0.066 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.839 ± 0.049 <sup>a</sup>	14.594 ± 1.091 <sup>ab</sup>	15.109 ± 0.881 <sup>a</sup>
Q-E 100:2	0.089 ± 0.004 <sup>c</sup>	0.840 ± 0.143 <sup>a</sup>	12.684 ± 1.918 <sup>cd</sup>	15.702 ± 0.977 <sup>a</sup>
Q-G 80:20	0.059 ± 0.010 <sup>b</sup>	1.396 ± 0.283 <sup>cd</sup>	18.944 ± 1.588 <sup>d</sup>	23.249 ± 3.211 <sup>e</sup>
Q-G-E 80:20:1	0.044 ± 0.003 <sup>a</sup>	1.346 ± 0.214 <sup>cd</sup>	12.024 ± 1.649 <sup>a</sup>	18.341 ± 0.919 <sup>b</sup>
Q-G-E 80:20:2	0.059 ± 0.007 <sup>b</sup>	1.144 ± 0.125 <sup>bc</sup>	15.514 ± 1.030 <sup>bc</sup>	18.915 ± 1.253 <sup>bc</sup>
Q-G 60:40	0.043 ± 0.007 <sup>a</sup>	1.238 ± 0.253 <sup>bcd</sup>	13.055 ± 2.098 <sup>d</sup>	19.379 ± 1.175 <sup>bcd</sup>
Q-G-E 60:40:1	0.044 ± 0.003 <sup>a</sup>	1.030 ± 0.157 <sup>ab</sup>	17.224 ± 1.918 <sup>cd</sup>	20.845 ± 1.106 <sup>cd</sup>
Q-G-E 60:40:2	0.045 ± 0.006 <sup>a</sup>	1.476 ± 0.226 <sup>d</sup>	24.808 ± 3.161 <sup>e</sup>	21.206 ± 2.002 <sup>d</sup>

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

### 3.2.1.1 Espesor y densidad

El espesor de las películas está principalmente influenciado por el total de sólidos en la solución filmogénica, entre mayor sea la concentración de sólidos mayor será el espesor de la película (García et al., 2004).

Los espesores de las películas formuladas presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), el rango de espesor fue de  $0.043 \pm 0.007$  a  $0.089 \pm 0.004$  mm, 4 formulaciones son las que obtuvieron los valores mínimos de espesor (Q-G-E 80:20:1, Q-G 60:40, Q-G 60:40, Q-G-E 60:40:2). Por otra parte, las películas que contienen mayores concentraciones de quitosano son las que presentaron mayor espesor, por ejemplo, la formulación Q-E 100:0.015 obtuvo un valor de espesor de  $0.089 \pm 0.004$  mm. Los valores de espesor del presente trabajo son inferiores a los reportados (con excepción de la película Q-G 100:0.2) por Wang et al. (2018) para películas de quitosano con extracto de semilla de soja negra (0.078 a 0.086 mm) y por Torres-León et al. (2018) para películas a base de cáscara de mango var. Ataulfo (0.10 y 0.11 mm). Joshi et al. (2016), menciona que el intervalo de espesor de las películas es amplio y muestra dependencia tanto en la composición como en las condiciones de procesamiento, esto explicaría las variaciones de espesor que se presentan en las 9 películas formuladas.

En los valores de densidad, la concentración del glicerol exhibe un aumento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en los tratamientos, por ejemplo, la película de quitosano puro obtuvo

una densidad de  $0.783 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$ , al aumentar la concentración de glicerol al 20 % y al 40 % las densidades aumentaron a  $1.396 \pm 0.283 \text{ g/cm}^3$  y  $1.381 \pm 0.253 \text{ g/cm}^3$ , respectivamente. Sin embargo, al incorporar las dos concentraciones de extractos disminuyeron significativamente los valores de la densidad en comparación de las películas control. Lozano-Navarro et al. (2018) explican que las variaciones de estos parámetros analizados están relacionadas en la porosidad, capacidad de filtración y aeración de los materiales.

### 3.2.1.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad fue afectado significativamente ( $p \geq 0.05$ ) por el incremento de las concentraciones de glicerol y extracto de Moringa, el contenido de humedad disminuye cuando la concentración de extracto es de 0.15 % en comparación con las películas control de quitosano puro y quitosano con 20 % de glicerol. Las interacciones entre el quitosano y el extracto de Moringa fueron los responsables de la disminución del contenido de humedad, debido a que podría existir una disminución de la disponibilidad de grupos hidroxilo y amino limitando las interacciones quitosano-agua a través de los enlaces de hidrógeno (Wang et al., 2013). Este comportamiento lo observan Wang et al. (2019) en películas de quitosano y extracto de *Herba lophatheri*, al aumentar a una concentración de extracto del 5%, el contenido de humedad disminuye de 26.47 % a 22.55 % con respecto la película control (sin extracto). Sin embargo, este comportamiento es diferente en las películas con 40 % de glicerol, el contenido de humedad exhibe un aumento con la presencia del extracto de Moringa ( $17.224 \pm 1.918 \%$  y  $24.808 \pm 3.161 \%$ ). Este comportamiento está asociado con el carácter hidrofílico del glicerol y su formación de enlaces de hidrógeno entre el plastificante y las moléculas de agua del ambiente, provocando el aumento en su capacidad de absorber el agua (Rodríguez-Núñez et al., 2014).

### 3.2.1.3 Porcentaje de Solubilidad

Las películas comestibles deben tener parámetros adecuados en sus propiedades mecánicas y en sus propiedades de transporte, especialmente al vapor de agua, así como diversas características como la transparencia, humedad y espesor, esto con el fin de lograr

una buena apariencia, sin embargo, es necesaria una buena solubilidad (Zamudio et al., 2016).

La solubilidad en agua de las 9 películas formuladas determinadas a 25 °C presentó diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ), las películas sin extracto tuvieron un rango de solubilidad de  $19.379 \pm 1.175\%$  y  $23.249 \pm 3.211\%$ . Remedio et al. (2019), reportan una solubilidad del 100 % en películas de quitosano con o sin sorbato de potasio o nisina como agentes antimicrobianos. Rodríguez-Núñez et al. (2014) informan que en películas plastificadas con 20 % y 40 % de glicerol los valores de porcentaje de solubilidad son 46.5 % y 65.6 % respectivamente y en películas de quitosano puro tenían una alta solubilidad, por lo tanto, no fue posible determinar la solubilidad, por lo que los resultados son superiores a los reportados en el presente trabajo. Este comportamiento puede estar relacionado con el grado de desacetilación del quitosano utilizado, el aumento de los grupos amino libres hace que aumente la solubilidad, y disminuye con el grado de desacetilación, es decir, el grado de desacetilación es el responsable de la solubilidad de las películas (Kasaai, 2009; Remedio et al., 2019). La baja solubilidad en películas comestibles es uno de los requisitos más importantes en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas (Altenhofen et al., 2009). Sin embargo, Li et al. (2014), mencionan que una película con alta solubilidad en agua puede degradarse rápidamente y modificarse fácilmente para mejorar sus propiedades físicas y químicas, sobre todo cuando se aplica como un recubrimiento comestible.

La adición de extracto de Moringa en las películas exhibió un comportamiento similar al de las pruebas del contenido de humedad, al aumentar la concentración de extracto, el porcentaje de solubilidad disminuye significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en las películas de quitosano puro y quitosano con 20 % de glicerol. Sin embargo, en las películas con 40 % de glicerol existe un ligero aumento en la solubilidad, esto es debido a la naturaleza del glicerol al ser un plastificante higroscópico, disminuye las interacciones moleculares de las cadenas poliméricas aumentando el volumen libre y permitiendo que los enlaces sean más accesibles a las moléculas de agua (Altenhofen et al., 2009).

### 3.2.3 Propiedades ópticas

#### 3.2.3.1 Transmisión de la luz y opacidad de las películas

Como material de envase, las películas deben proteger a los alimentos de los efectos de la luz, especialmente la radiación UV (Li et al., 2014). La Tabla 7 muestra los resultados del escaneo espectroscópico de todas las longitudes de onda (entre 200 y 800 nm) las cuales fueron analizadas en las películas formuladas. El comportamiento de las películas en las longitudes de onda estudiadas contra la transmitancia de luz indica que las películas sin extracto son las que presentan mayor transmisión de luz, siendo la formulación con 20 % glicerol sin extracto la película que permite mayor paso de luz de las 9 películas realizadas. Al adicionar el extracto de *Moringa oleifera* (0.07 y 0.15% en peso), las películas de quitosano tendieron a disminuir la transmisión de luz, en comparación con las películas control (sin extracto). La disminución de la transmisión de luz puede atribuirse a la adición de compuestos fenólicos de los extractos naturales, debido a la presencia de grandes cantidades de anillos de benceno de los compuestos fenólicos, principalmente por los flavonoides, lo que resulta en el cambio de transmisión de luz de las películas (Bao et al., 2009). Se observa que la adición de glicerol a las películas sin extracto aumentó el porcentaje de transmisión de luz, por ejemplo, en la formulación con quitosano puro a una longitud de onda de 400 nm el valor de transmisión de luz fue de 52.5 % al adicionar glicerol en la formulación Q-G 80:20, el valor aumentó a 75.5%.

Resultados similares fueron reportados por Kaya et al. (2018), explicando que el aceite de semillas y extracto de *Berberis crataeginas* en películas de quitosano disminuye significativamente la transmisión de luz en la región visible. Otro estudio reveló que en películas de almidón de maíz y harina de berenjena la transmitancia de luz disminuyó debido a los pigmentos naturales y a los compuestos fenólicos que estaban disponibles para actuar como barrera de la luz UV (Nouraddini et al., 2018).

En la opacidad el rango de valores fue de  $2.72 \pm 0.27$  a  $6.95 \pm 0.24$ , siendo las películas plastificadas con 40 % de glicerol las que presentan los valores superiores de opacidad. Existió un incremento de la opacidad en estas películas con la adición de extracto de Moringa, la opacidad aumenta de  $4.34 \pm 0.06$  a  $6.95 \pm 0.24$ . Siripatrawan y Harte (2010) mencionaron que las películas con extracto de té verde son menos transparentes que las películas sin extracto. Dos Santos Caetano et al. (2018) reportaron la opacidad en películas

de almidón de yuca, la cual es influenciada por la incorporación de extractos de residuos de calabaza, aceite esencial de orégano y glicerol; estos aditivos podrían ocasionar una mayor opacidad debido a la pérdida de homogeneidad en la matriz polimérica.

Diversos autores explican que la diferencia en la opacidad entre las muestras podría deberse a la composición de la materia prima, la diferencia en el color, el grosor, la presencia de compuestos fenólicos de los extractos naturales y su interacción con la película de quitosano, estos componentes pueden aglomerarse en la matriz de la película para producir una superficie oscura (Krittika et al., 2010; Pelisari et al., 2013; Maniglia et al., 2017).

### 3.2.3.2 Evaluación de color

Uno de los parámetros más importantes para que los consumidores elijan productos alimenticios es el color (Nouraddini et al., 2018). Mediante el aspecto visual, el color de las películas puede influenciar la aceptabilidad de un producto. Cuando se mezclan dos o más compuestos para formar la matriz polimérica, se crean interacciones químicas y físicas que pueden provocar cambios en el color de las películas (Sivarooban et al., 2008). Los resultados del efecto de color de las películas formuladas se presentan en la Tabla 7. Se midieron los parámetros del CIELab ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ), así como la cromaticidad, la diferencia de color ( $\Delta E$ ) y el ángulo ( $^\circ$ Hue). Los resultados mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los parámetros de color, lo que indica que el color se vio afectado por las diferentes concentraciones de extracto de *Moringa oleifera* y el glicerol.

Se observa que el valor de luminosidad ( $L^*$ ), de las películas sin extracto, son las que presentaron altos valores de luminosidad; la incorporación del 20 % y 40 % de glicerol no presentó diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, existió un ligero aumento en los valores de  $L^*$ , los valores cambiaron de  $88.93 \pm 0.87$  en películas de quitosano puro a  $90.24 \pm 0.24$  en películas con 40 % de glicerol. La presencia de *Moringa oleifera* en forma de extracto afectó en los valores de  $L^*$  al volver a las películas de quitosano puro, 20 % glicerol y 40 % glicerol más oscuras, por ejemplo, la concentración de 0.15 % de extracto en las películas de quitosano puro tendió a disminuir en 24.37 % el valor de  $L^*$ . Esto fue influenciado directamente por el color verde de los extractos de *Moringa oleifera* que se ejerció en las películas de quitosano plastificadas cambiando el color significativamente

( $p \leq 0.05$ ) con respecto a las películas sin extracto. De acuerdo con Du et al. (2009) el color de las películas comestibles está directamente influenciado por el tipo y la concentración de los extractos añadidos.

Los valores del parámetro  $a^*$ , indican un color rojo cuando los valores son positivos y un color verde cuando son negativos, las 8 películas formuladas caen dentro los colores con tonalidad verdes y una película dentro de la tonalidad roja (Q-E 100:2).

Por otra parte, los valores de  $b^*$ , que indican colores amarillos para los valores positivos y colores azules para valores negativos, los resultados presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) y las 9 formulaciones quedaron dentro los colores amarillos. Las películas sin extracto, son las que presentaron los valores menores de  $b^*$ , al aumentar la cantidad de extracto y la presencia de glicerol en las formulaciones, las películas aumentaron el valor de  $b^*$ . Este mismo efecto se observa en el valor de cromaticidad ( $C^*$ ) que representa el grado de saturación específico, la adición de extracto provocó un incremento del grado de saturación de las películas ( $p \leq 0.05$ ).

La diferencia de color ( $\Delta E$ ), de las formulaciones sin extracto fueron las películas control y se emplearon como comparación con las formulaciones con extracto. La formulación que presentó mayor diferencia de color fue Q-E 100:2 con un valor de  $58.68 \pm 3.41$  y la formulación que presentó la menor diferencia de color fue Q-G-E 80:20:2 con un valor de  $27.12 \pm 1.33$ , por lo que el aumento de color estuvo influenciado directamente por el extracto de *Moringa oleifera*.

El ángulo ( $^\circ\text{Hue}$ ), representa el tono o matiz dentro del diagrama del sistema de notación de color de CIELab. El tono es definido como el grado en que un estímulo puede describirse como similar o diferente de los estímulos que se describen como rojos, verde, azul y amarillo (Fairchild, 2004). Los resultados del  $^\circ\text{Hue}$  de las películas analizadas presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Las películas sin adición de extracto son las que presentaron menor valor de ángulo, sin embargo, la adición de extracto de Moringa, estos valores aumentaron significativamente. A pesar de que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas, el tono de las películas se mantuvo dentro del rango de los tonos verdes. El color característico del extracto de Moringa (verde) influyó directamente en la tonalidad de las películas, estas interacciones de las concentraciones de extracto con la matriz

polimérica provocaron los cambios de color de las películas (Du et al., 2009; Sivarooban et al., 2008)

Tabla 6. Efecto sobre la evaluación de color de las películas

Formulación	L*	a*	b*	C	ΔE	° h
Q 100	88.93 ± 0.87 <sup>e</sup>	-0.09 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.31 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.20 <sup>a</sup>	-----	173.17 ± 6.81 <sup>a</sup>
Q-E 100:1	72.36 ± 5.44 <sup>b</sup>	-0.29 ± 0.04 <sup>h</sup>	53.52 ± 4.35 <sup>d</sup>	53.33 ± 4.35 <sup>f</sup>	55.78 ± 4.72 <sup>c</sup>	179.04 ± 0.89 <sup>c</sup>
Q-E 100:2	67.25 ± 2.62 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.41 <sup>i</sup>	55.71 ± 2.66 <sup>d</sup>	55.73 ± 2.67 <sup>f</sup>	58.68 ± 3.41 <sup>c</sup>	179.75 ± 3.61 <sup>c</sup>
Q-G 80:20	89.92 ± 1.63 <sup>e</sup>	-0.57 ± 0.07 <sup>ef</sup>	4.58 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.54 ± 0.82 <sup>b</sup>	-----	173.71 ± 2.65 <sup>ab</sup>
Q-G-E 80:20:1	84.32 ± 3.39 <sup>d</sup>	-2.74 ± 0.04 <sup>a</sup>	27.47 ± 1.32 <sup>b</sup>	27.60 ± 1.36 <sup>d</sup>	27.12 ± 1.33 <sup>a</sup>	178.14 ± 0.97 <sup>ab</sup>
Q-G-E 80:20:2	76.91 ± 0.35 <sup>c</sup>	-1.46 ± 0.20 <sup>c</sup>	45.16 ± 0.46 <sup>c</sup>	45.18 ± 0.46 <sup>c</sup>	45.58 ± 0.47 <sup>b</sup>	178.14 ± 0.26 <sup>c</sup>
Q-G 60:40	90.24 ± 0.24 <sup>e</sup>	-0.41 ± 0.02 <sup>f</sup>	3.00 ± 0.54 <sup>a</sup>	3.02 ± 0.55 <sup>ab</sup>	-----	172.34 ± 0.94 <sup>a</sup>
Q-G-E 60:40:1	77.30 ± 2.32 <sup>c</sup>	-0.68 ± 0.14 <sup>d</sup>	43.86 ± 4.30 <sup>c</sup>	43.88 ± 4.28 <sup>e</sup>	44.24 ± 4.68 <sup>b</sup>	178.61 ± 1.15 <sup>c</sup>
Q-G-E 60:40:2	76.87 ± 2.15 <sup>c</sup>	-2.23 ± 0.10 <sup>b</sup>	45.16 ± 0.46 <sup>c</sup>	45.04 ± 1.89 <sup>e</sup>	45.48 ± 2.39 <sup>b</sup>	177.55 ± 1.09 <sup>bc</sup>

\*Letras diferentes por columna indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

Tabla 7. Transmisión de la luz (%T) y opacidad

Formulación	Longitud de onda (nm)								Opacidad
	200	280	350	400	500	600	700	800	
Q 100	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.0 <sup>e</sup>	35.0 ± 3.31 <sup>d</sup>	52.5 ± 3.78 <sup>e</sup>	63.0 ± 3.38 <sup>c</sup>	67.3 ± 3.82 <sup>d</sup>	68.8 ± 2.81 <sup>bc</sup>	69.6 ± 2.85 <sup>abc</sup>	2.92 ± 0.31 <sup>a</sup>
Q-E 100:1	0.10 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	20.7 ± 4.45 <sup>bc</sup>	34.5 ± 4.10 <sup>d</sup>	56.3 ± 3.55 <sup>b</sup>	60.9 ± 3.21 <sup>c</sup>	63.6 ± 2.46 <sup>a</sup>	66.0 ± 2.76 <sup>a</sup>	3.68 ± 0.16 <sup>b</sup>
Q-E 100:2	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	9.53 ± 1.12 <sup>a</sup>	23.2 ± 1.55 <sup>b</sup>	55.23 ± 1.49 <sup>b</sup>	61.8 ± 1.56 <sup>c</sup>	64.8 ± 1.57 <sup>ab</sup>	68.2 ± 1.64 <sup>ab</sup>	2.76 ± 0.35 <sup>a</sup>
Q-G 80:20	0.02 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>f</sup>	54.7 ± 2.60 <sup>e</sup>	75.5 ± 2.51 <sup>f</sup>	83.8 ± 2.31 <sup>d</sup>	86.0 ± 2.00 <sup>e</sup>	87.2 ± 1.70 <sup>d</sup>	87.9 ± 1.22 <sup>e</sup>	2.72 ± 0.27 <sup>a</sup>
Q-G-E 80:20:1	0.13 ± 0.01 <sup>f</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>e</sup>	9.35 ± 2.29 <sup>a</sup>	24.4 ± 1.96 <sup>bc</sup>	54.8 ± 1.59 <sup>b</sup>	61.8 ± 1.60 <sup>c</sup>	65.0 ± 1.51 <sup>ab</sup>	68.3 ± 1.50 <sup>ab</sup>	5.04 ± 0.27 <sup>d</sup>
Q-G-E 80:20:2	0.00 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	9.87 ± 1.24 <sup>a</sup>	24.4 ± 1.60 <sup>bc</sup>	57.0 ± 1.24 <sup>b</sup>	64.5 ± 0.92 <sup>cd</sup>	68.2 ± 0.88 <sup>bc</sup>	71.3 ± 0.62 <sup>bc</sup>	3.24 ± 0.11 <sup>ab</sup>
Q-G 60:40	0.07 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.05 ± 0.0 <sup>d</sup>	25.2 ± 4.49 <sup>c</sup>	52.6 ± 1.26 <sup>e</sup>	64.9 ± 0.45 <sup>c</sup>	64.9 ± 0.45 <sup>cd</sup>	71.13 ± 0.85 <sup>c</sup>	72.5 ± 0.80 <sup>d</sup>	4.34 ± 0.06 <sup>c</sup>
Q-G-E 60:40:1	0.06 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.04 ± 0.0 <sup>c</sup>	16.4 ± 0.28 <sup>b</sup>	25.1 ± 0.97 <sup>c</sup>	55.2 ± 3.12 <sup>b</sup>	55.6 ± 3.30 <sup>b</sup>	65.50 ± 3.77 <sup>ab</sup>	68.13 ± 3.78 <sup>ab</sup>	5.78 ± 0.59 <sup>e</sup>
Q-G-E 60:40:2	0.02 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.76 ± 2.58 <sup>a</sup>	14.3 ± 0.55 <sup>a</sup>	43.6 ± 1.23 <sup>a</sup>	48.6 ± 1.23 <sup>a</sup>	63.10 ± 2.10 <sup>a</sup>	66.36 ± 1.50 <sup>a</sup>	6.95 ± 0.24 <sup>f</sup>

\*Letras diferentes por columna indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

### 3.2.4 Propiedades mecánicas

#### 3.2.4.1 Resistencia a la tensión (RT)

Las propiedades mecánicas indican la resistencia de las películas y su capacidad para aumentar la integridad mecánica de los alimentos (Khazaei et al., 2016). La resistencia a la tensión (TS) es el esfuerzo máximo que puede soportar una película antes de romperse (Gennadios et al., 1997) y el porcentaje de elongación en la ruptura (%  $E_r$ ) es la elongación máxima de la película antes de su ruptura (Krochta y Mulder-Johnson, 1997). El módulo de elasticidad (EM) o módulo de Young es el parámetro relacionado con la rigidez del material a bajas deformaciones, es la pendiente inicial de la gráfica donde se relaciona la tensión ( $\sigma$ ) vs la deformación ( $\epsilon$ ). Los resultados obtenidos de las pruebas de tensión de las películas formuladas se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de las pruebas de tensión

Formulación	RT (MPa)	$E_r$ (%)	ME (MPa)
Q 100	$32.34 \pm 4.30^d$	$18.03 \pm 4.46^b$	$1003.9 \pm 199.99^d$
Q-E 100:1	$49.94 \pm 6.56^e$	$7.95 \pm 0.85^a$	$903.45 \pm 121.19^{cd}$
Q-E 100:2	$47.14 \pm 9.53^e$	$9.28 \pm 2.05^a$	$759.38 \pm 63.33^c$
Q-G 80:20	$14.26 \pm 3.34^{ab}$	$29.33 \pm 8.28^c$	$330.8 \pm 93.33^b$
Q-G-E 80:20:1	$24.19 \pm 5.54^c$	$32.71 \pm 4.82^c$	$311.79 \pm 65.30^b$
Q-G-E 80:20:2	$20.25 \pm 4.67^{bc}$	$28.81 \pm 5.85^c$	$226.12 \pm 45.89^b$
Q-G 60:40	$9.99 \pm 1.89^a$	$33.18 \pm 3.61^c$	$24.19 \pm 3.86^a$
Q-G-E 60:40:1	$7.38 \pm 1.27^a$	$9.24 \pm 2.66^a$	$214.86 \pm 50.50^b$
Q-G-E 60:40:2	$6.16 \pm 1.33^a$	$13.97 \pm 2.42^{ab}$	$44.07 \pm 11.02^a$

\*Letras diferentes por columna indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

Se puede observar que la concentración del plastificante y el extracto afectó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) los parámetros de tensión (resistencia a la tensión, elongación a la ruptura y módulo elástico). Las películas de quitosano puro presentaron un valor de esfuerzo a la tensión de  $32.34 \pm 4.30$  MPa; sin embargo, la adición de las dos concentraciones de extracto aumentó significativamente estos valores siendo de  $49.94 \pm 6.56$  MPa y  $47.14 \pm 9.53$  MPa en las formulaciones Q-E 100:1 y Q-E 100:2, respectivamente.

La adición de 20 % de glicerol, exhibieron características de plastificación, la película control Q-G 80:20 disminuyó la resistencia a la tensión en comparación de la película Quitosano puro de  $32.34 \pm 4.30$  MPa a  $14.26 \pm 3.34$  MPa, este comportamiento lo observan

Rodríguez-Núñez et al. (2014) y explican que el plastificante penetra a través de las cadenas del polímero, disminuyendo las fuerzas intermoleculares y aumentando la movilidad de estas. Sin embargo, en las películas de quitosano puro y quitosano plastificadas con 20% glicerol, los valores de la resistencia a la tensión aumentaron con la presencia de las dos concentraciones de extracto. Rambabu et al. (2018) reportan un efecto similar en películas de quitosano y extracto de hojas de mango, las películas con 3% y 5% de extracto tienden a incrementar los valores del esfuerzo a la tensión y en el módulo elástico. Estos autores, explican que el aumento en estos parámetros se puede atribuir a las interacciones que existen entre los compuestos fenólicos con los grupos amino de las cadenas de quitosano, que causan una reticulación de las cadenas del polímero y por consiguiente una estructura rígida.

La adición de 40% de glicerol en las formulaciones, el esfuerzo a la tensión disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en comparación de las películas sin extracto de quitosano puro y quitosano con 20% glicerol. La resistencia a la tensión de la película con 40% glicerol sin extracto fue de  $9.99 \pm 1.89$  MPa, al adicionar los extractos siguió disminuyendo la resistencia a la tensión al igual los valores de elongación y módulo de elasticidad de las dos siguientes formulaciones (Q-G-E 60:40:1 y Q-G-E 60:40:2 con  $7.38 \pm 1.27$  MPa y  $6.16 \pm 1.33$  MPa respectivamente. El glicerol y los extractos fueron los responsables de esta disminución presentando un efecto antiplastificante, y se han observado en polisacáridos plastificados con agua, glicerol y otros componentes (Rodríguez-Núñez et al., 2014). Diversos autores han observado este comportamiento cuando la concentración de plastificante es igual o mayor al 40% en peso del polímero. Sanyang et al. (2015) reportan el efecto antiplastificante en películas de almidón de azúcar de palma (*Arenga pinnata*) al incorporar 45% de glicerol, las películas exhiben una disminución de 15.82 a 3.99 MPa y con sorbitol a la misma concentración de plastificante disminuye notablemente de 9.59 a 1.67 MPa. Chang et al. (2006) observan que el glicerol ejerce un efecto antiplastificante en la elongación de películas de almidón de tapioca a medida que aumentaba el contenido de glicerol. Gonçalves et al. (2019) reportan una disminución en los valores de esfuerzo a la tensión, módulo elástico y elongación a la ruptura en películas de acetato de celulosa plastificadas con 50% de glicerol, en comparación de las películas sin plastificante y plastificadas hasta 40%. Este efecto antiplastificante se le atribuye a la interrupción del enlace carbohidrato-carbohidrato que

reorganiza las cadenas del polímero, y en consecuencia altera la matriz (Rodríguez-Núñez et al., 2014) es decir, existe una separación de fases de las películas altamente plastificadas.

Se observa que, a mayor esfuerzo máximo, menor es el porcentaje de elongación. Las películas sin extracto presentaron una mayor elongación. Estos resultados se deben por la acción del glicerol, esta penetra a través del biopolímero e interfiere con las cadenas de quitosano, por lo tanto, disminuye la atracción molecular y aumenta la movilidad de las cadenas del polímero, haciendo que las películas sean más flexibles (Ziani et al., 2008). Sin embargo, en las películas de quitosano puro, la adición de extracto afecto disminuyendo significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la elongación, acción ocasionado por la presencia de compuestos fenólicos del extracto, al interaccionar estos compuestos con el quitosano, la estructura del material se vuelve rígida y, por lo tanto, disminuye su flexibilidad (Rambabu et al., 2018). Sin embargo, este comportamiento no se observa en las películas plastificadas con 20 % glicerol, el valor de elongación es similar al control. El efecto antiplastificante se observa en las películas con 40 % glicerol, el valor de elongación disminuye drásticamente por la alta concentración de plastificante.

El módulo elástico, mide la rigidez intrínseca de las películas, la película de quitosano puro mostro el módulo elástico más alto ( $1003.9 \pm 199.99$  MPa), este resultado es similar a los obtenidos por Hosseini et al. (2013), el valor de reportado por estos autores para las películas de quitosano puro fue de 1036.6 MPa. La presencia de las concentraciones de extracto de Moringa y de las concentraciones de glicerol causó una reducción en la rigidez de las películas. Sánchez-González et al. (2010) encontraron un comportamiento similar al disminuir los valores del módulo elástico de películas de quitosano y aceite esencial de bergamota. Esto podría explicarse por la discontinuidad en la matriz por la incorporación de extracto de Moringa y el plastificante, causando una disminución de las fuerzas intermoleculares entre las macromoléculas de quitosano, al mejorar la movilidad y flexibilidad de las cadenas del polímero y a su vez, conduce a una débil respuesta mecánica (Sánchez-González et al., 2010; Bajjić et al., 2019).

#### 3.2.4.2 Rasgado

Los comportamientos mecánicos están estrechamente relacionados con la estructura y la formación de la película. Las películas se formaron en cajas Petri y existió una dirección

igual de todos los ingredientes, es decir, se considera homogénea la dirección de las películas (Tulamandi et al., 2016). Los resultados de la prueba de rasgado se expresan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de las pruebas de rasgado

Formulación	Rasgado (Kgf)
Q 100	0.086 ± 0.01 <sup>a</sup>
Q-E 100:1	0.251 ± 0.10 <sup>b</sup>
Q-E 100:2	0.202 ± 0.01 <sup>b</sup>
Q-G 80:20	0.094 ± 0.04 <sup>a</sup>
Q-G-E 80:20:1	0.093 ± 0.01 <sup>a</sup>
Q-G-E 80:20:2	0.232 ± 0.01 <sup>b</sup>
Q-G 60:40	0.043 ± 0.00 <sup>a</sup>
Q-G-E 60:40:1	0.086 ± 0.01 <sup>a</sup>
Q-G-E 60:40:2	0.220 ± 0.01 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes por columna indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

Las películas control (películas sin extracto) son las que presentaron los valores mínimos de la fuerza rasgado con un rango entre  $0.043 \pm 0.00$  a  $0.094 \pm 0.04$  Kgf, se observa un ligero aumento en las fuerzas de rasgado al adicionar 20% de glicerol. Sin embargo, la incorporación de 40% de glicerol, disminuye 54% la fuerza de rasgado. Anderson y Simsek (2018) observan un comportamiento similar en películas de arabinoxilanos extraídos de salvado de trigo, la incorporación de 25 % de glicerol tendió a aumentar los valores de la resistencia al rasgado, pero al aumentar la concentración del plastificante hasta 50% la resistencia disminuyó significativamente.

La adición de las concentraciones de extracto de *Moringa oleifera* tendió a aumentar los valores de la resistencia de rasgado en las películas de quitosano puro, 20% glicerol y 40% glicerol, diversos autores mencionan la variación de estos resultados se podrían deber por las interacciones de los grupos fenólicos y los grupos aminos de las cadenas del quitosano permitieron tener una mayor rigidez en el material y en consecuencia un aumento en este parámetro analizado (Madera-Santana et al., 2014; Rodríguez-Núñez et al., 2014; Rambabu et al., 2018).

### 3.2.5 Velocidad de Transmisión de Vapor de Agua (VTVA)

La velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) lo define la ASTM como el flujo constante de vapor de agua en unidad de tiempo a través del área de la unidad de un cuerpo, normal a superficies paralelas específicas, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en cada superficie. En general, la velocidad de transmisión de vapor de agua en películas como material de envase juegan un papel importante en las reacciones de deterioro de los alimentos; por lo tanto, es la propiedad más estudiada de las películas comestibles (Madera-Santana et al., 2014). En la Figura 2 se muestran los valores de VTVA para las películas de quitosano y adicionando extracto de *Moringa oleifera*.

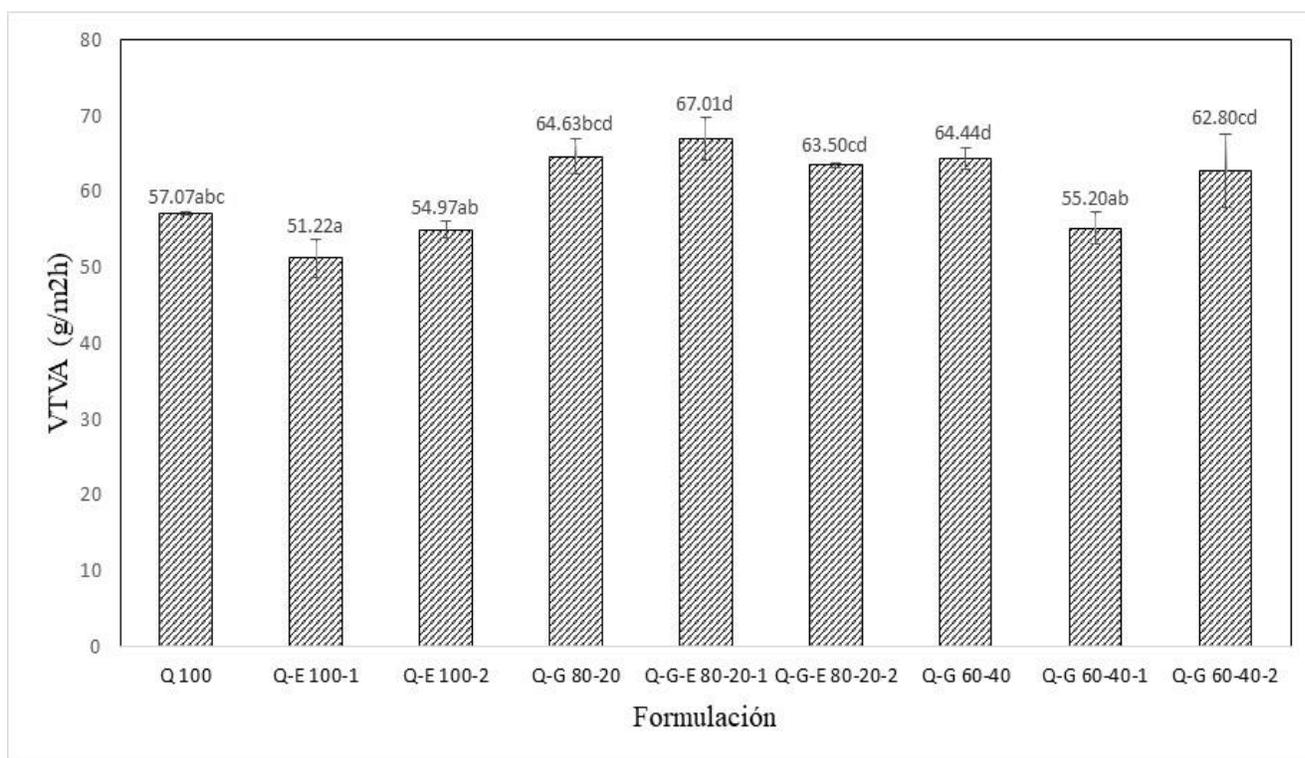


Figura 2. Velocidad de transmisión de vapor de agua. Letras diferentes indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

La VTVA máxima se presentó cuando las películas de quitosano tienen 20% de glicerol y 0.07 g/100 mL de extracto de *Moringa oleifera* ( $67.01 \pm 2.87$  g/m<sup>2</sup>h). Las películas control (sin extracto) son las que presentaron menor VTVA, la película de quitosano puro

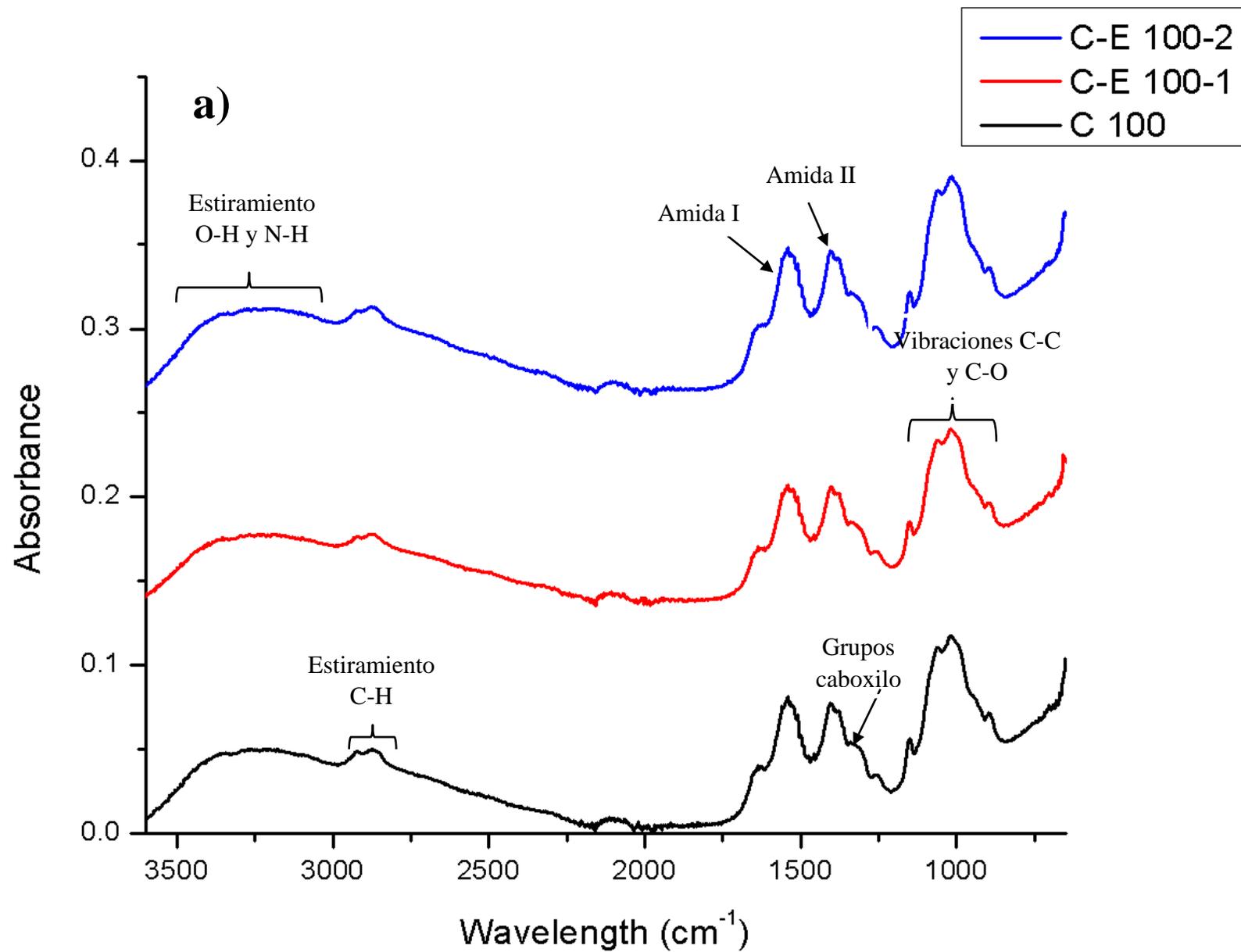
obtuvo una VTVA de  $57.07 \pm 0.20 \text{ g/m}^2\text{h}$ , resultado similar a los reportados por Xu et al. (2005) con  $57.73 \text{ g/m}^2\text{h}$  y por Rodríguez-Núñez et al. (2014) con un valor de  $57.0 \text{ g/m}^2\text{h}$ . Se observó que al adicionar 0.07 g de extracto en las películas de quitosano puro y quitosano con 40% glicerol, la VTVA disminuyó significativamente ( $p \leq 0.05$ ), este comportamiento se observó en películas de quitosano adicionado con 2% y 3% de extracto de hojas de betel (*Piper betle linn*), donde se reduce gradualmente la VTVA con una mayor concentración de extracto (Thuong et al., 2019). Este comportamiento se podría deber por la reducción de la afinidad de la red polimérica al agua por la disponibilidad de los enlaces covalentes de los grupos funcionales y los enlaces hidrófilos (Liu et al., 2016; Talón et al., 2017).

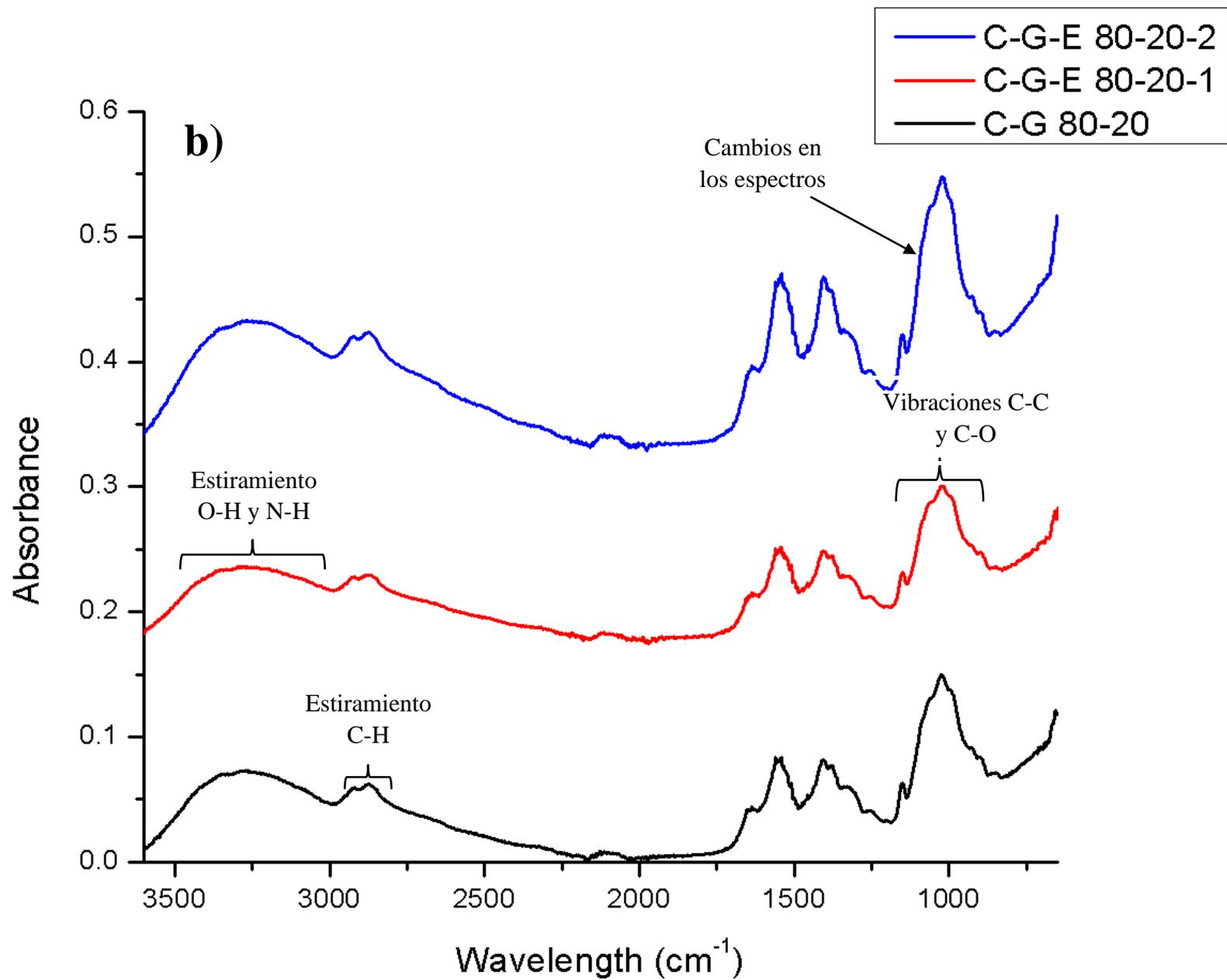
### 3.2.6 Propiedades estructurales

#### 3.2.6.1 Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier

La espectroscopía FTIR se realizó con la finalidad de identificar las interacciones moleculares entre el quitosano y los compuestos fenólicos presente en el extracto de Moringa (Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016; Talón et al., 2017). Las muestras de quitosano puro (Figura 3a) exhiben bandas características a  $3,600\text{-}3,000 \text{ cm}^{-1}$  (vibración-estiramiento de las bandas hidroxilos O-H y grupo amino N-H),  $1635 \text{ cm}^{-1}$  estiramiento C=O (grupo carbonilo),  $1,558 \text{ cm}^{-1}$  banda N-H (amida II) del N-acetilo, estiramientos C-O a  $1,047 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1,022 \text{ cm}^{-1}$  y  $942 \text{ cm}^{-1}$  (Rodríguez-Núñez et al., 2014; Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016). En la Figura 3b y 3c, se presentan los espectros de las películas plastificadas con 20% y 40% de glicerol, respectivamente. Rodríguez-Núñez et al. (2014), indican que, en películas de quitosano plastificadas con glicerol, debe aparecer una señal a  $1,400 \text{ cm}^{-1}$  (flexión en el plano hacia el -OH). Diversos autores indican que la presencia de compuestos fenólicos debe de presentar bandas a  $1,700 \text{ cm}^{-1}$ , estiramientos a  $1,600 \text{ cm}^{-1}$  estiramiento C=C, cambios en los espectros entre  $1,400 \text{ cm}^{-1}$  y  $1200 \text{ cm}^{-1}$  (grupos hidroxilos de los fenoles) y disminución de la absorción a  $1550 \text{ cm}^{-1}$ , así como un nuevo pico a  $1730\text{-}1715 \text{ cm}^{-1}$  (Siripatrawan y Harte, 2010; Siripatrawam y vitchayakitti 2016; Talón et al., 2017; Lauritano Souza et al., 2018). Cuando se agregan los extractos de Moringa los espectros son similares al de las películas de quitosano puro, sin embargo, se logra observar ligeros cambios en las intensidades de las bandas a  $3,500\text{-}3,000 \text{ cm}^{-1}$  y a  $1,600\text{-}1,200 \text{ cm}^{-1}$  en las películas de quitosano con 40% glicerol y 0.15% de extracto (Figura 3c). Talón et al. (2017) explican que la concentración de los compuestos fenólicos presentes en los extractos no es suficiente para dar una respuesta

sensible en los espectros, por lo tanto, la cantidad de extracto influye en los cambios estructurales de las películas.





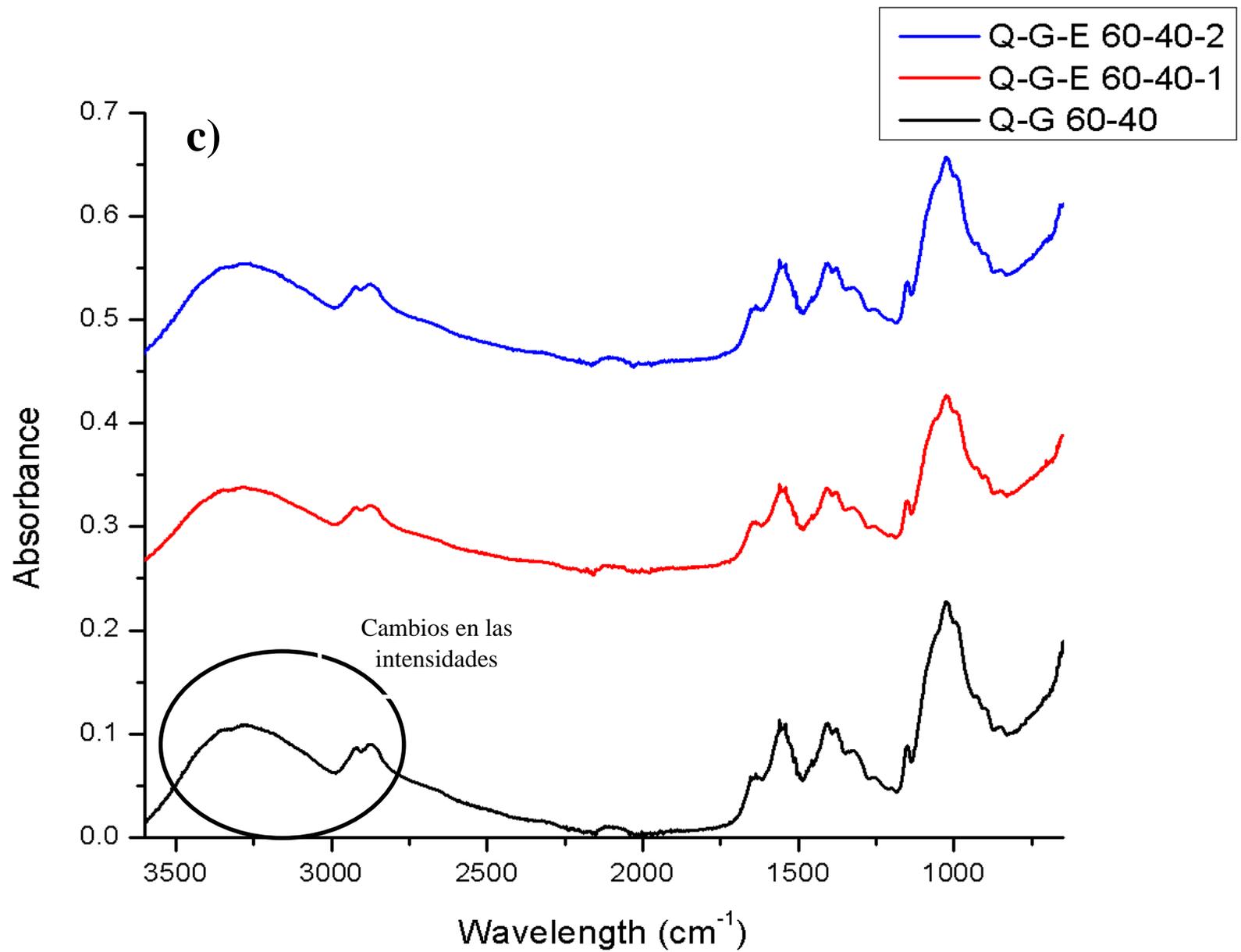
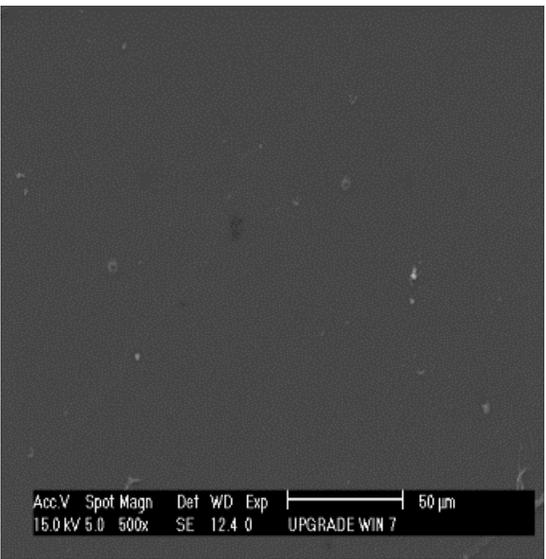
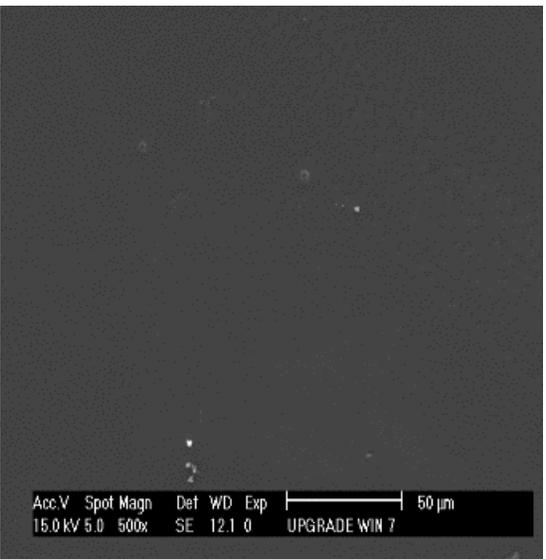
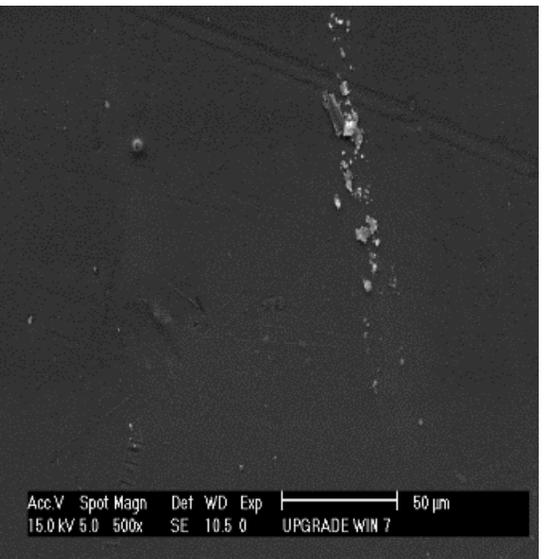
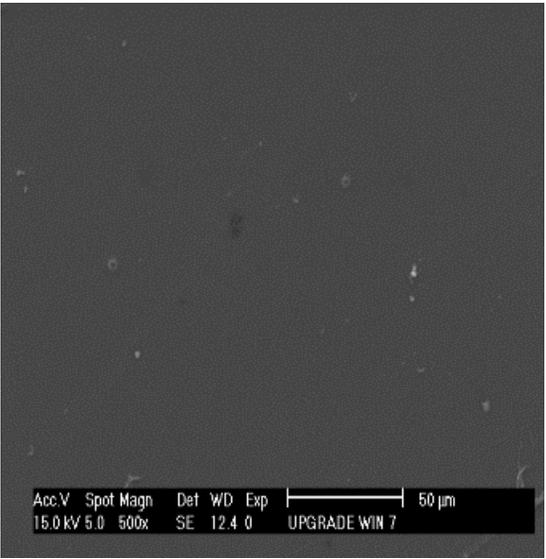
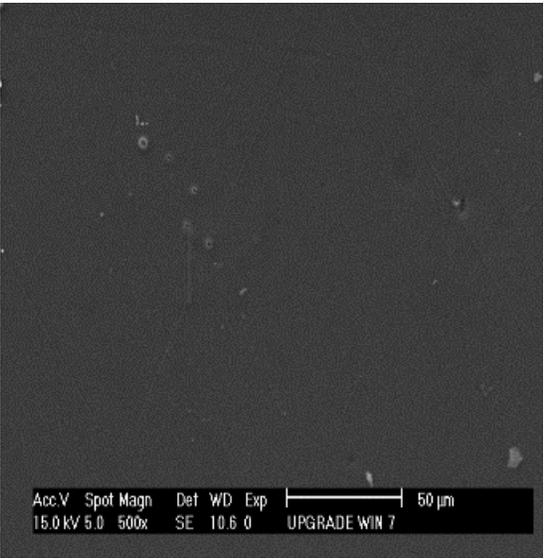
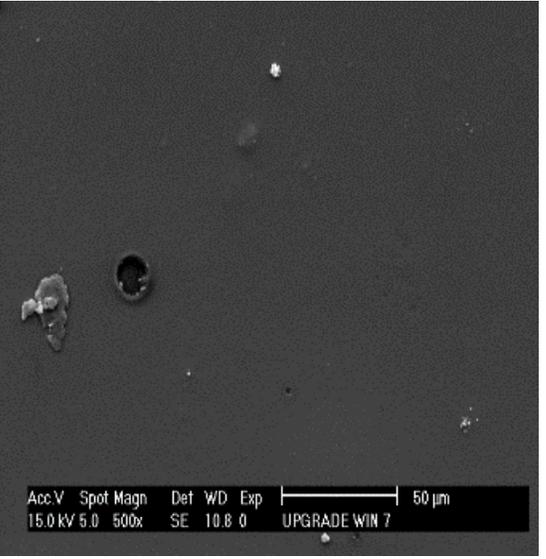


Figura 3. Espectros infrarrojos de las películas formuladas

a) quitosano puro y extractos b) Quitosano, 20% glicerol y extractos c) quitosano, 40% glicerol y extractos

### 3.2.7 Morfología de las películas formuladas

La Figura 4, muestra las micrográficas por microscopía electrónica de barrido de las películas de quitosano y glicerol adicionadas con extracto de *Moringa oleifera*. Se observa que las superficies de las películas control (sin extracto) son homogéneas y con algunos poros, la adición de 0.07 y 0.15 % de extracto ocasionaron la aparición de burbujas. En las películas de quitosano con 40 % glicerol, la adición de 0.07 % de extracto afectó la superficie del material al ser heterogénea en algunas regiones de la película, se observan dos fases en la superficie, lo cual podría deberse a que no existe una interacción de los componentes del extracto con la cadena del polímero. Talón et al. (2017) mencionan que la microestructura de las películas se ve afectada por la organización espacial de sus diferentes componentes y por cómo interactúan durante el proceso de secado. Por otra parte, al aumentar la cantidad de extracto (0.15 %) en la misma formulación (Q-E 60:40), la superficie fue homogénea y con poca presencia de burbujas. Madera-Santana et al. (2014) mencionan que la incorporación de plastificantes en el quitosano produce cambios en la estructura del polímero, ya que el glicerol puede ingresar al interior de las cadenas de los polisacáridos, donde interrumpe los enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares, haciendo que el polímero sea plástico y formando una fase continua de una película plastificada. El efecto antiplastificante se puede observar en las películas plastificadas con 40% y en presencia de las concentraciones de extracto, las micrográficas muestran una superficie heterogénea al existir separación de las fases de los extractos y el plastificante de la cadena del polímero.

Formulación	Sin adición de extracto	0.07 %	0.15%
	Superficie		
Q-G 100-0			
Q-G 80-20			

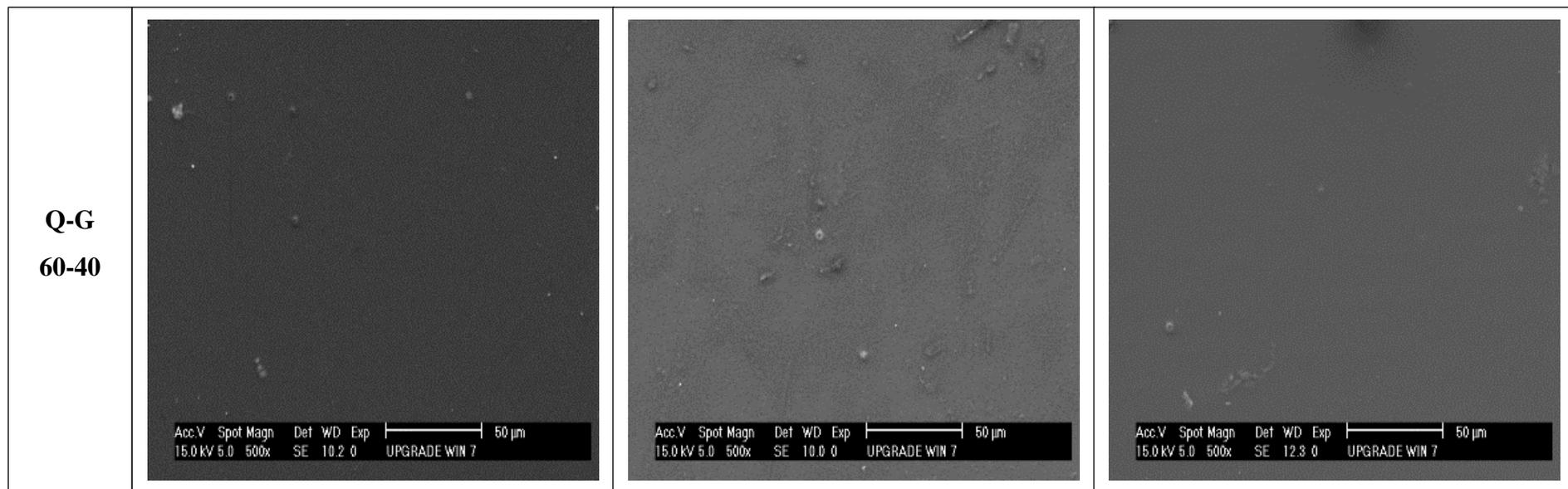


Figura 4. Micrografías de las películas formuladas

### 3.2.8 Propiedades activas

#### 3.2.8.1 Fenoles totales y actividad antioxidante

La adición de antioxidantes en envases activos es una técnica para extender la vida útil de productos alimenticios al mejorar los aspectos nutricionales y estéticos sin afectar la integridad de los alimentos (Guilbert et al., 1996). Las técnicas de captación de radicales libres del DPPH y ABTS son métodos importantes para medir las propiedades antioxidantes en envases activos. Los resultados de los análisis se encuentran en la Tabla 10 y 11.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH y ABTS

Formulación	% Inhibición de radicales	
	DPPH	ABTS
Q 100	1.65 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.88 <sup>a</sup>
Q-E 100:1	10.97 ± 1.13 <sup>e</sup>	22.48 ± 1.42 <sup>c</sup>
Q-E 100:2	21.12 ± 1.65 <sup>d</sup>	27.34 ± 0.98 <sup>de</sup>
Q-G 80:20	1.25 ± 0.22 <sup>a</sup>	4.40 ± 1.01 <sup>a</sup>
Q-G-E 80:20:1	16.61 ± 0.83 <sup>c</sup>	23.08 ± 0.24 <sup>cd</sup>
Q-G-E 80:20:2	27.10 ± 2.51 <sup>e</sup>	30.27 ± 1.26 <sup>e</sup>
Q-G 60:40	1.32 ± 0.23 <sup>a</sup>	9.47 ± 0.42 <sup>b</sup>
Q-G-E 60:40:1	28.02 ± 1.46 <sup>e</sup>	47.56 ± 5.78 <sup>f</sup>
Q-G-E 60:40:2	39.31 ± 0.05 <sup>f</sup>	49.00 ± 3.20 <sup>f</sup>

\*Letras diferentes por columna indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

Al adicionar el extracto de *Moringa oleifera* en las películas formuladas se observa un incremento significativo de la actividad antioxidante ( $p \leq 0.05$ ) expresado como porcentaje de inhibición de radicales libres en ambas técnicas analizadas. La formulación que presenta la mayor actividad es Q-G-E 60:40:2 con  $39.31 \pm 0.05$  % y  $49.0 \pm 03.20$  % de captación de radicales libres en los métodos DPPH y ABTS, respectivamente. A pesar de que ambas técnicas se fundamentan en la captación de los radicales generados, el porcentaje de inhibición en el método DPPH con respecto al ABTS es inferior, esto debido a la baja selectividad del ABTS, que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real (Roginsky y Lissi, 2005).

Por otra parte, las películas control sin adición de extracto (Q 100, Q-G 80:20 y Q-G 60:40) son las películas que presentan la menor cantidad de actividad anti radical en ambas técnicas, no existiendo diferencia estadística entre ellos ( $p \geq 0.05$ ).

Los resultados del contenido de fenoles totales expresados en mg EAG y de la actividad antioxidante en términos de concentraciones equivalentes en Trolox de las películas formuladas se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

Formulación	Fenoles totales mg EAG/100 g	DPPH mg ET/100 g	ABTS mg ET/100 g
Q 100	1.27 ± 0.07 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	10.91 ± 1.15 <sup>a</sup>
Q-E 100:0.07	6.46 ± 0.73 <sup>b</sup>	7.54 ± 1.71 <sup>b</sup>	37.65 ± 4.78 <sup>b</sup>
Q-E 100:0.15	18.46 ± 1.26 <sup>c</sup>	23.03 ± 1.47 <sup>d</sup>	45.55 ± 4.63 <sup>b</sup>
Q-G 80:20	1.24 ± 0.17 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	7.70 ± 1.48 <sup>a</sup>
Q-G-E 80:20:0.07	37.70 ± 1.46 <sup>d</sup>	17.55 ± 1.63 <sup>c</sup>	40.47 ± 2.51 <sup>b</sup>
Q-G-E/ 80:20:0.15	53.73 ± 4.23 <sup>e</sup>	35.43 ± 4.97 <sup>e</sup>	58.52 ± 4.12 <sup>c</sup>
Q-G 60:40	1.58 ± 0.30 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	16.94 ± 0.06 <sup>a</sup>
Q-G-E 60:40:0.07	94.82 ± 4.33 <sup>f</sup>	38.99 ± 2.94 <sup>e</sup>	85.32 ± 7.81 <sup>d</sup>
Q-G-E 60:40:0.15	123.93 ± 2.68 <sup>g</sup>	65.07 ± 2.80 <sup>f</sup>	121.29 ± 14.87 <sup>e</sup>

ND. No detectado

\*Letras diferentes por columna indican diferencia significativa con una  $p \leq 0.05$  por la prueba de Duncan.

Las películas sin extracto de *Moringa oleifera* presentan los valores mínimos de Fenoles totales y de concentraciones equivalente de Trolox de los métodos DPPH y ABTS por lo que no presentan diferencias significativas entre ellos ( $p \geq 0.05$ ). Se observa que la adición de diferentes concentraciones de extracto y el aumento de la cantidad de glicerol en las formulaciones incrementa significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el contenido de fenoles totales y de la actividad antioxidante. La formulación que presentó los valores máximos fue Q-G-E 60:40:2 obteniendo valores del contenido de fenoles totales de 123.93 ± 2.68 mg EAG/100 g de película y de 65.07 ± 2.80 y 121.29 ± 14.87 mg ET/ 100 g de película en DPPH y ABTS, respectivamente.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a sus propiedades redox, lo que les permite actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno o extintores

de oxígeno singlete (Sankhalkar y Vernekar, 2016). Existe una relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de las plantas, lo que permite que las películas formuladas con quitosano y extracto de *Moringa oleifera* presente actividad antioxidante. Esta actividad es probable a que se deba por la presencia compuestos fenólicos adheridos en las películas, principalmente los flavonoides, ya que las hojas de *Moringa oleifera* se consideran una fuente de compuestos antioxidantes con actividad suficiente para reducir la actividad de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Lin et al., 2018).

### 3.3 Conclusiones

Las hojas y flores de *Moringa oleifera* recolectados en la ciudad de Mérida son buena fuente de proteínas y grasas, así como de compuesto bioactivos con actividad antioxidante; sin embargo, fueron las hojas de la planta las que presentaron mayor concentración de compuestos bioactivos analizados en comparación de las flores. Por lo tanto, el uso de harinas de flores y hojas moringa se pueden utilizar como aditivos nutricionales, al poder enriquecer los alimentos. En análisis proximal y de compuestos bioactivos, los resultados fueron similares a los reportados en literatura, pero se tienen que tener en cuenta, que los métodos de análisis, el lugar en donde se cultiva, y los factores ambientales, pueden hacer que los resultados varíen.

Se utilizaron las hojas de moringa como fuente de antioxidante (por las alta concentraciones de compuestos bioactivos en comparación de las flores) y se utilizó glicerol como plastificante. La incorporación de estos dos aditivos en las películas de quitosano hizo cambios considerables en las propiedades físicas, mecánicas, ópticas, de barrera, morfológicas, estructurales y activas. En las propiedades ópticas, la incorporación de glicerol exhibió un aumento en la transmisión de luz; sin embargo, la incorporación de los extractos este parámetro disminuyó significativamente. En las propiedades mecánicas, la incorporación de extracto hizo que las películas se vuelvan más resistentes en comparación de las películas control, pero la adición de 40% en peso de glicerol, se logró observar un efecto antiplastificante por la gran concentración de plastificante en las formulaciones, este efecto hizo que la elongación de las películas disminuyera. Las concentraciones de glicerol tendieron a aumentar los valores de VTVA, pero al incorporar los extractos, estos valores disminuyen.

La actividad antioxidante aumenta considerablemente en las películas con 40% glicerol, esto fue comprobado al cuantificar los fenoles totales y la actividad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH. Considerando todos los resultados obtenidos, las películas de la presente investigación pueden ser una alternativa como un uso de material de envase o como recubrimiento comestible.

## Bibliografía

- Altenhofen, M., Krause, A., y Guenter, T. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with  $\text{Ca}^{+2}$  ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77, 736-742.
- Anderson, C., y Simsek, S. (2018). Mechanical profiles and topographical properties of films made from alkaline extracted arabinoxylans from wheat bran, maize bran, or dried distillers' grain. *Food Hydrocolloids*, 86, 78-86.
- André, C., Castanheira, I., Cruz, J. M., Paseiro, P., y Sanches-Silva, A. (2010). Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (5), 229-246. doi:10.1016/j.tifs.2009.12.003.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., y Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21, 17-25.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15. Arlington A Association of Official Analytical Chemists, 1990
- Arowosegbe, S. (2019). Comparative studies on the phytochemical content and proximate of different parts of *Moringa oleifera* plant grown in Ado-Ekiti, Nigeria. *Bulletin of Pure and Applied Sciences*, 38 (1), 1-10.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., y Logret, P. (1994). Standardisation the extrain de propolis et identification et principaux constituants. *Journal the Pharmacie the Belgique*, 49, 462-468.
- ASTM (2002). Standard test method for tensile properties of thin plastics sheeting. D882-02. Annual book of ASTM standards. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM (2008). Standard Test Method for Tear-Propagation Resistance (Trouser Tear) of plastics film and thin sheeting by a single-tear method. D1938-19. Annual book of ASTM standards. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM (2010). Standard test methods for water vapor transmission of materials. E96/E96M-10. Annual book of ASTM standards. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

- Auras, R., Harte, B., y Selke, S. (2004). Effect of water on the oxygen barrier properties of polyethylene Terephthalate and Poly (lactide) films. *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 1790-1803.
- Avila-Sosa, R., y López-Malo, A. (2008). Aplicación de sustancias antimicrobianas a películas y recubrimientos comestibles. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2(2), 4-13.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sajema, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., y Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.
- Bajić, M., Ročnik, T., Oberlintner, A., Scognamiglio, F., Novak, U., y Likozar, B. (2019). Natural plant extracts as active components in chitosan-based films: A comparative study. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100365. doi:10.1016/j.fpsl.2019.100365
- Baldwin, E. A., Nispero-Carriedo, M. O., y Baker, R. A. (1995). Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables, *HortScience*. 30, 35.
- Baldwin, E. A., Nispero-Carriedo, M. O., y Baker, R. A. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 509-524.
- Bao, S., Xu, S., y Wang, Z. (2009). Antioxidant activities and properties of gelatin films incorporated with tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 89, 2692-2700.
- Barbosa-Cánovas, C. V. (2012). Películas y recubrimientos comestibles en contexto con otras tecnologías novedosas de conservación y procesado de alimentos. En: Olivas Orozco, G. I., González-Aguilar, G. A., Martín-Belloso, O., y Soliva-Fortuny, R. (Eds). *Películas y recubrimientos comestibles propiedades y aplicaciones en alimentos*. México. AM editores. 19.
- Berger, R. G., Lunkenbein, S., Strohle, A., y Hahn, A. (2011). Antioxidants in food: mere myth or magic medicine? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(2), 162-171.
- Blanco-Fernandez, B., Rial-Hermida, M. I., Alvarez-Lorenzo, C., y Concheiro, A. (2012). Edible chitosan/acetylated monoglyceride films for prolonged release of vitamin E and

- antioxidant activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(2), 626–635. doi:10.1002/app.38766.
- Bof, M. J., Bordagaray, V. C., Locaso, D. E., y García, M. A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocolloids*, 51, 281-294.
- Bossett, J., Gallmann, P. U., y Sieber, R. (1994). Influence of light transmittance of packaging material on the shelf-life of milk and dairy products. A review. *Food Packaging and Preservation*, Mathlouthi, M. (Ed), New York, Chapman & Hall Inc., 222-268.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237-248.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Breda, C. A., Morgado, D. L., Assis, O. B. G., y Duarte, M. C. T. (2017). Processing and characterization of chitosan films with incorporation of ethanolic extract from “pequi” peels. *Macromolecular Research*, 25(11), 1049–1056. doi:10.1007/s13233-017-5143-4
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food- A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cagri, A., Ustunol, Z., y Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 1162-1169.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., y Flores, S. K. (2010). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875. doi:10.1007/s11947-010-0434-1
- Cao, H., Wang, J., Dong, X., Han, Y., Ma, Q., Ding, Y., Zhao, F., Zhang, J., Chen, H., Xu, Q., Xu, J., y Deng, X. (2015). Carotenoid accumulation effects redox status, starch metabolism, and flavonoid/anthocyanin accumulation in citrus. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1-16.
- Cao, N., Yang, X., y Fu, Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 729-735.
- Capitani, M. I., Matus-Basto, A., Ruiz-Ruiz, J. C., Santiago-García, J. L., Betancur-Ancona, D. A., Nolasco, S. M., Tomás, M. C., y Segura-Campos, M. R. (2016). Characterization of

- biodegradable films based on *Salvia hispanica* L. protein and mucilage. *Food Bioprocess and Technology*, 9, 1276-1286.
- Castillo-López, R., León-Félix, J., Angulo-Escalante, M., Gutiérrez-Dorado, R., Muy-Rangel, M., y Basilio Heredia, J. (2017). Nutritional and phenolic characterization of *Moringa oleifera* leaves grown in Sinaloa, México. *Pakistan Journal of Botany*, 49(1), 161-168.
- Castro-López, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., y Martínez-Ávila, G. C. G. (2017). Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chemistry*, 237, 1139-1148.
- Catala, R., y Gavara, R. (2001). Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de alimentos envasados. *Arbor CLXVIII*. 661, 109-127.
- Cervera-Fantoni, A. L. (2003). Envases y embalaje: (la venta silenciosa). Editorial ESIC, 294.
- Chang, Y. P., Abd Karim, A., y Seow, C. C. (2006). Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films. *Food Hydrocolloids*, 20, 1-8.
- Cheng, L. H., Karim, A. A., y Seow, C. C. (2006). Effects of water-glycerol and water-sorbitol interactions on the physical properties of Kojac Glucomannan films. *Journal of Food Science*, 71(2), E62-E67.
- Chiralt, A., Fabra, M. J., y Sánchez-González, L. (2012). Propiedades de las películas comestibles. En: Olivas Orozco, G. I., González-Aguilar, G. A., Martín-Belloso, O., y Soliva-Fortuny, R. (Eds) *Películas y recubrimientos comestibles propiedades y aplicaciones en alimentos*. AM editores, México, 23 y 25.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J., y Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 622-626.
- Darmadji, P., y Izumimoto, I. (1994). Effect of Chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38, 243-254.
- Del Valle, V., Hernández, P., Guarda, A., y Galotto, M. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry

- (*Fragaria ananassa*) shelf-life. Food Chemistry, 91(4), 751-756.  
Doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.002
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., y Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. International Dairy Journal. 14, 273-285.
- Dillar, C. J., y German, A. R. (2000). Phytochemical: nutraceuticals and human health: A review. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80, 1744-1756.
- Dos Santos Caetano, K., Almeida Lopes, N., Haas Costa, T. N., Brandelli, A., Rodrigues, E., Hickmann Flores, S., y Cladera-Olivera, F. (2018). Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. Food Packaging and Shelf Life. 16, 138-147.
- Du, W. X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E., Mandrell, R., y Friedman, M. (2009). Antibacterial effects of allspice, garlic and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapor-phase methods. Journal of Food Science, 74(7), 390-397.
- Eça, K. S., Sartori, T., y Menegalli, F. C. (2014). Films and edible coatings containing antioxidants- a review. Brazilian Journal of Food Technology, 17(2), 98-112. doi:10.1590/bjft.2014.017.
- Fairchild, M. (2004). Color appearance models: CIECAM02 and beyond. Tutorial slides for IS&T/SID 12th color imaging conference.
- Felton, L. A. (2013). Mechanisms of polymeric film formation. International Journal of Pharmaceutics, 457(2), 423-427. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.12.027.
- Fernández, L. E., Díaz de Apocada, E., Cebrián, M., Villarán, M. C., y Maté, J. I. (2006). Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. European Food Research and Technology, 224(4), 415-420.
- Finley, J. W., Kong, A-N., Hintze, K. J., Jeffrey, E. H., Ji, L. L., y Lei, X. G. (2011). Antioxidants in Foods: State of the science important to the food industry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(13), 637-6846. doi:10.1021/jf2013875.
- Foster B., Arnason J., y Briggs, C. (2005). Natural health products and drug disposition. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, 203-226.

- Frankel, E. N., y Finley, J. W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4901-4908.
- Gajdos, M., Eichler, A., y Hafner, J. (2004). CO adsorption on close-packed transition and noble metal Surface: trends from an initio calculation. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(8), 1141.
- García M., Pinotti A., Martino M., y Zaritzky, E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56(3), 339-345.
- García, M. A., Martino, M. N., y Zaritzky, N. E. (2006). Lipid addition to improve properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65(6), 941-944. doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb09397.x.
- Gennadios, A., Hanna, M. A., y Kurth, L. B. (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *LWT- Food Science and Technology*, 30(4), 337-350. doi.org/10.1006/fstl.1996.0202.
- Gennadios, A., y Weller, C. L. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44(10), 63-69.
- Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernandez-Lopez, J., Muñoz, L. A., y Viuda-Martos, M. (2015). Assessment of antibacterial and antioxidant properties of Chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*). *LWT-Food Science and Technology*, 64, 1057-1062.
- Gómez-Estaca, J., Gavara, C. R., y Catalá, M. R. (2010). Innovaciones en el envasado de los alimentos: Envasado activo y envasado inteligente. En: *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos*. Ed. IMC. Burgos, 141-152.
- Gonçalves, S. M., dos Santos, D. C., Motta, J. F. G., Ribeiro, R. S., Chávez, D. W. H., y de Melo, N. R. (2019). Structure and functional properties of cellulose acetate films incorporated with glycerol. *Carbohydrate Polymers*, 209, 190-197.
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. L., y Guilbert, S. (1994). Edible composites films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal Food Science and Technology*, 82, 395-403.
- Goy, R. C., De Brito, D., y Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polymers*, 19(3), 241-247. doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013.

- Gross, R., y Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297(5582), 803-807.
- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. En: Mathlouthi, M. (Ed). *Food Packaging and Preservation*. Londres: Elsevier Applied Science Publishers, 371-394
- Guilbert, S., Gontard, N., y Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf life perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT-Food Science and Technology*, 29, 10-17.
- Guzmán-Maldonado, S. H., y Díaz Fuentes, V. H. (2017). Diversidad en la composición fenólica y capacidad antioxidante de colectas de Moringa en el estado de Chiapas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(7), 1641-1645.
- Han, J. H. (2014). Edible films and coatings. *Innovation in Food Packaging*, 213-255. doi:10.1016/b978-0-12-394601-0.00009-6
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., y Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3), 235-244.
- Hosseini, M. H., Razavi, S. H., y Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of food Processing and Preservation*, 33, 727-743.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., y Ghavi, F. F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1490-1495. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.081.
- Ismail, B. P. (2017). Ash content determination. En: *Food Analysis Laboratory Manual*. Food Science Text Series. Springer, Cham.
- Joshi, D., Goyal, A., y Rath, G. (2016). Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Delivery*, 23(2), 363-377.
- Kasaai, M. R. (2009). Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1667-1676.

- Kaya, M., Ravikumar, P., Ilk, S., Mujtaba, M., Akyuz, L., Labidi, J., Salaberria, A. M., Cakmak, Y. S., y Erkul, S. K. (2018). Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 287–297. doi:10.1016/j.ifset.2017.11.013
- Kefford, J. F., y Chandler, B. V. (1960). The chemical constituents of citrus fruits. *Advances in Food Research*, 9, 285-372.
- Kester, J. J., y Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, 40(2), 47-59.
- Khazaei, N., Esmaili, M., y Djomeh, Z. E. (2016). Effect of active edible coatings made by basil seed gum and thymol on oil uptake and oxidation in shrimp during Deep-fat frying. *Carbohydrate Polymers*, 137, 249-254.
- Klopffer, M. H., y Flaconneche, B. (2001). Transport properties of gases in polymers: bibliographic review. *Oil & Gas Science and Technology. Revue d'IFP Energies Nouvelles*, 56, 14185-14190.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., y Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373-386.
- Krittika, N., Ki, M. K., y Gi, H. R. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films coatings ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98, 377-384.
- Krochta, J. M., y Mulder-Johnson, D. E. (1997). Functional, physical and morphological properties of methyl cellulose and fatty acid-based edible film barriers. *LWT-Food Science and Technology*, 25, 404-411.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726–732.
- Lauritano Souza, V. G., Rodrigues, P. F., Duarte, M. P., y Fernando, A. L. (2018). Antioxidant migration studies in chitosan films incorporated with plant extracts. *Journal of Renewable Materials*, 6(5), 548-558.

- Lee, J., Durst, R.W., y Wrolstad, R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juice, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.
- Li, J., Miao, J., Wu, J., Chen, S., y Zhang, Q. (2014). Preparation and characterization of active gelation-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, (37), 166-173.
- Lin, M., Zhang, J., y Chen, X. (2018). Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods*, 47, 469-479
- Liu, Y., Cai, Y., Jian, X., Wu, J., y Le, X. (2016). Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 52, 564-572
- Liu, Y., Wang, X., Wei, X., Gao, Z., y Han, J. (2018). Values, properties and utility of different parts of *Moringa oleifera*: an overview. *Chinese Herbal Medicines*, 10 (4), 371-378.
- López, C. (2011). Xantano biopoliméricos: propiedades reológicas y aplicaciones. *cienciAcierta*, 7(25).
- Lozano-Navarro, J., Díaz-Zavala, N., Velasco-Santos, C., Melo-Banda, J., Páramo-García, U., Paraguay-Delgado, F., García-Alamilla, R., Martínez-Hernández, A., y Zapién-Castillo, S. (2018). Chitosan-Starch films with natural extracts: physical, chemical, morphological and thermal properties. *Materials*, 11, 120.
- Lu, Y., Zhang, M., Meng, X., Wan, H., Zhang, J., Tian, J., Hao, S., Jin, K., y Yao, Y. (2015). Photoperiod and shading regulate coloration and anthocyanin accumulation in the leaves of *malus crabapples*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(3), 249-256.
- Lupano, C. E. (2013). *Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento*. 1ra. Ed. La Plata: Universidad Nacional de la Plata, 218
- M'Hiri, N., Ioannou, I., Boudhrioua, N., y Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in Orange peel. *Food & Bioproducts Processing*, 96, 161-170.

- Madera-Santana, T. J., Freile-Pelegrín, Y., y Azamar-Barrios, J. A. (2014). Physicochemical and morphological properties of plasticized poly (vinyl alcohol)-agar biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 176-184.
- Maniglia, B. C., Tessaro, L., Lucas, A. A., y Tapia-Blácido, D. R. (2017). Bioactive films based on babassu mesocarp flour and starch. *Food Hydrocolloids*. 70, 383-391.
- Mathlouthi, M. (2003). *Food packaging and preservation*. Springer Science and Business Media, Ed. Ilustrada, 275.
- Méndez, A. D. G., y Cárdenas, G. M. P. (2010). Influencia del cloruro de calcio y de un tipo de empaque sobre las propiedades fisicoquímicas y la textura de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) durante el almacenamiento. *Revista Facultad Nacional Agraria-Medellin*, 63(1), 5417-5427.
- Meneses, S. M. O. y Valenzuela, J. R. (2008). La atmosfera modificada: una alternativa para la conservación de alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2), 112-123.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., y Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Min, S., Harris, L., y Krochta, J. (2005). Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, 70(7), M332-338.
- Mohammed, S. Y., Eltahir, E. E. O. A. S., Elbadri, M. E., y Kabbashi, A. S. (2018). Proximate Composition of *Moringa Oleifera* Lam. from different Regions in Sudan. *International Invention of Scientific Journal*, 2(07).
- Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortíz-Vázquez, E., Vargas y Vargas, M. L., Betancur-Ancona, D., y Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508-515.
- Moon, J. K., y Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assay for plant and food components. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57(5), 1655-1666.

- Mueller, W.B. (1982). U.S. Patent No. 4, 352, 849. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.
- Nascimento, K. O., Reis, I., y Augusta, I. (2017). Total phenolic and antioxidant capacity of flower, leaf and seed of *Moringa oleifera*. International Journal of Food Nutrition Research, 1, 1-6.
- Navarro, J. P., García-Romeu, M., Alcaraz, L. J., de la Cruz, N., Martínez, G., Ferreira, P., y Hortal, R. (2007). Guía práctica de diseño de envases y embalajes para la distribución de productos. ITNE. ECODISPACK. Valencia, 25.
- NMX-F-527-1992. Alimentos. determinación de sólidos totales, sólidos disueltos y sólidos en suspensión en agua.
- No, H., Meyers, S., Prinyawiwatkul, W., y Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. Journal of Food Science, 72, 87-100.
- Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E. y Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's form seven cultivar of *Moringa oleifera* Lam. Industrial Crops and Products, 83, 166-176.
- Nouraddini, M., Esmaili, M., y Mohtarami, F. (2018). Development and characterization of edible films based on eggplant and corn starch. International Journal of Biological Macromolecules, 120, 1639-1645.
- Novo, M. (2009). La educación ambiental, una genuina educación para el desarrollo sostenible. Revista de Educación, (1), 195-217.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., y Chandra, S. R. (2016): Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science, 5(47)
- Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., y Farkas, D. F. (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. Food Biotechnology, 5 (1), 45-57.
- Park, J-H., Cha, B., y Lee, Y. N. (2003). Antibacterial activity of Chitosan acetate on food-borne enteropathogenic bacteria. Food Science and Biotechnology, 12(1), 100-103

- Pastor, C., Sánchez-González, L., Chiralt, A., Cháfer, M., y González-Martínez, C. (2013). Physical and antioxidant properties of Chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30, 272-280.
- Pelissari, F. M. Andrade-Mahecha, M. M., Do Amaral Sobral, P. J., y Menegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, 30, 681-690.
- Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clinic Nutritional Insights*, 1098:54-58
- Perez-Vendrell, A. M., Hernandez, J. M., Llaurodo, L., Schierle, J., y Brufau, J. (2001). Influence of Source and Ratio of Xanthophyll Pigments on Broiler Chicken Pigmentation and Performance. *Poultry Science*, 80 (3), 320–326. doi:10.1093/ps/80.3.320.
- Peterson, N. (1970). Patent No. 3, 524,795. Washington, DC: US Patent and Trademark Office.
- Peyron, A. (1991). L'enrobage et les produits filmogènes: un Nouveau mode bémballage. *Viandes et produits carnés*, 12(2), 41-46.
- Phan, T. D., Debeaufort, F., Voilley, A., y Luu, D. (2009). Niopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, 90, 548-558.
- Philip, J. C., Ritchie, R. J. y Guy, K. (2013). Biobased plastics in bioeconomy. *Trends Biotechnology*, 31(2), 65-67.
- Pokorny, J. (2007a). Antioxidants in food preservation En: Rahman, M. S. (Ed.). *Handbook of Food Preservation*. 2. ed. New York: CRC Press, 259-286. (Food Science and Technology).
- Pokorný, J. (2007b). Are natural antioxidants better-and safer-than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629-642. doi:10.1002/ejlt.200700064.
- Ponce, A. G., Roura, S. I., del Valle, C. E., y Moreira, M. R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 294-300.

- Pontual, E. V., Carvalho, B. E., Bezerra, R. S., Coelho, L. C., Napoleao, T. H., y Paiva, P. M. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flower. *Food Chemistry*, 135, 1848-1854.
- Raghavendra, S., Rajashekara, E., Nagaraj, M. S., Ramesh, C. K., Paramesha, M., y Aditya Rao, S. J. (2015). Evaluation of phytoconstituents, nutrient composition and antioxidant properties in *Moringa oleifera* BhagyaKDM 01 variety. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(4), 369-379.
- Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P. L., y Cocolletzi, H. H. (2018). Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1234-1243. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.196
- Ramel, F., Mialoundama, A.S., y Havaux, M. (2013). Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 64(3), 799-805.
- Reimberg, M.C., Colombo, R., y Yariwake, J. (2009). Multivariate analysis of the effects of soil parameters and environmental factor son the flavonoid content of leaves *Passiflora incarnata* L., Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 853-859.
- Reische, D., Lillard, D., y Eiternmiller, R. (2002). Antioxidants. En: AKOH, C. C.; MIM, D. B. (Ed.). *Food Lipids*. New York: CRC Press, 2002. (Food Science and Technology).
- Remedio, L. N., Silva dos Santos, J. W., Vieira Maciel, V. B., Yoshida, C. M. P., y Aparecida de Carvalho, R. (2019). Characterization of active chitosan films as a vehicle of potassium sorbate or nisin antimicrobial agents. *Food Hydrocolloids*, 87, 830-838
- Rhim, J. W. (2004). Physical and mechanical properties of water-resistant sodium alginate. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 323-330.
- Risch, J.S. (2009). Food packaging history and innovations. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(18), 8089-8092.
- Rivero, S., García, M. A., y Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90, 531-539.
- Rodríguez-Núñez, J. R., Madera-Santana, T. J., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., y Soto-Valdez, H. (2014). Chitosan/hydrophilic plasticizer-based films: preparation,

- physicochemical and antimicrobial properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 22, 41-51.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., y Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract for *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246-254.
- Roginsky, V., y Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254. doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004.
- Roller, S., y Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. 47(1-2), 67-77.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A. y Fernández-López, J. (2013). *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* Essential oils. *Food Control*, 30(2), 386-392.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., y González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible Chitosan films containing bergatom essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 277-283. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.047.
- Sánchez-Peña, Y. A., Martínez-Avila, G. C. G., Sinagawa-García, S. R., y Vázquez-Rodríguez, J. A. (2013). *Moringa oleifera*; importancia, funcionalidad y estudios involucrados. *Acta Química Mexicana*, 5 (9), 25-30.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., y Jagus, R. (2006). Study on the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39 (6), 749-754.
- Sankhalkar, S., y Vernekar, V. (2016). Quantitative and qualitative análisis of phenolic and flavonoid content in *Moringa oleifera* lam and *Ocinum tenuiflorum* L. *Pharmacognosy Research*, 8, 16-21.
- Sanyang, M. L., Sapuan, S. M., Jawaid, M., Ishak, M., y Sahari, J. (2015). Effect of plasticizer type and concentration on tensile, thermal and barrier properties of biodegradable films based on Sugar Palm (*Arenga pinnata*) starch. *Polymers*, 7, 1106-1124.
- Saucedo-Pompa, S., Torres-Castillo, J. A., Casto-López, C., Rojas, R., Sánchez-Alejo, E. J., Ngangyo-Heya, M., y Martínez-Ávila, G. C. G. (2018). *Moringa* plants: Bioactive

- compounds and promising application in food products. *Food Research International*, 111, 438-450.
- Seydim, A. C., y Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. y Jeon, Y. J. (1999). Food application of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 37-51.
- Siddhuraju, P., y Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extract of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 15, 2144-2155.
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. J. A., Gómez-Guillén, M. C., y Bifani, V. (2013). Natural additives in bioactive edible films and coatings: Functionality and applications in food. *Food Engineering Reviews*, 5, 200-216.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viniculture*, 16, 144-158.
- Siripatrawan, U. (2016). Active food packaging from chitosan incorporated with plant polyphenols. *Novel Approaches of Nanotechnology in Food*, 465-505. doi:10.1016/b978-0-12-804308-0.00014-5.
- Siripatrawan, U., y Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidants activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770-775.
- Siripatrawan, U., y Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695-702.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., y Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.
- Sreelatha, S. y Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 303-311.

- Talón, E., Trifkovic, K. T., Nedovic, V. A., Bugarski, B. M., Vargas, M., Chiralt, A., y González-Martínez, C. (2017). Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1153–1161.
- Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 71-78.
- Thuong, N. T., Ngoc Bich, H. T., Thuc, C. N. H., Quynh, B. T. P., y Minh, L. V. (2019). Preparation and Characterization of Piper Betle Linn. Leaf Extract Incorporated Chitosan Films as Potential Active Food Packaging Materials. *Chemistry Select*, 4(27), 8150–8157.
- Torres-León, C., Vicente, A. A., Flores-López, M. L., Rojas, R., Serna-Cock, L., Alvarez-Pérez, O. B., y Aguilar, C. N. (2018). Edible films and coatings based on mango (var. Ataulfo) by-products to improve gas transfer rate of peach. *LWT- Food Science and Technology*, 97, 624-631.
- Tulamandi, S., Rangarajan, V., Rizvi, S. S. H., Singhal, R. S., Chattopadhyay, S. Kr., y Saha, N. C. (2016). A biodegradable and edible packaging film based on papaya puree, gelatin, and defatted soy protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 60-71.
- Valero-Valdivieso, M., Ortegón, Y., y Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: avances y perspectivas. *Dyna*, 80(181), 171-180.
- Vats, S., y Gupta, T. (2017). Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. From Rajasthan, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(1), 239-248.
- Vázquez-León, L. A., Páramo-Calderón, D. E., Robles-Olvera, V. J., Valdés-Rodríguez, O. A., Pérez-Vázquez, A., García-Alvarado, M. A., y Rodríguez-Jimenes, G. C. (2017). Variation in bioactive compounds and antiradical activity of *Moringa oleifera* leaves; influence of climatic factors, tree age, and soil parameters. *European Food Research Technology*, 243, 1593-1608.
- Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., y Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47 (3), 254-263.
- Villada, H. S. y Acosta, H. A. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 12(2), 5-13.

- Vongsak, B., Pongtio, S., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., y Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571
- Wang, L., Dong, H., Men, H., Tong, J., y Zhou, J. (2013). Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 32, 35-41.
- Wang, L., Guo, H., Wang, J., Jiang, G., Du, F., y Liu, X. (2019). Effect of *Herba Lophatheri* extract on the physicochemical properties and biological activities of chitosan film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15, 51-57.
- Wang, X. C., Yong, H. M., Gao, L., Li, L., Jin, M. J., y Liu, J. (2018). Preparation and characterization of antioxidant and pH-sensitive based on chitosan and black soybean seed coat extract. *Food Hydrocolloids*, 89, 56-66.
- Wypych, G. (2004). *Handbook of plasticizers*. Toronto: ChemTec publishing; p. 687.
- Xiao, C., Zhu, L., Luo, W., Song, X. y Deng, Y. (2010). Combined action of pure oxygen pretreatment and chitosan coating incorporated with Rosemary extracts on the quality of fresh-cut pears. *Food Chemistry*, 121(4), 1003-1009.
- Xu, T., Gao, C., Feng, X., Yang, Y., Shen, X., y Tang, X. (2019). Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum Arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 230-236. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.189.
- Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A., y Nag, D. (2005). Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21, 185-192.
- Ye, M., Neetoo, H. y Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, 25, 260-268.
- Zago, G., Karina, I., García, F., María, Y., Bernardo, D., y María, L. (2010). Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-reducción. *INHRR*, 41(1), 25-30.

- Zamudio, E., Aguilar, C., Salcedo, G., Angoa, V., y Mena, H. (2016). Caracterización fisicoquímica de películas comestibles a base de cera de candelilla. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 17(1), 1- 7.
- Ziani, K., Oseas, J., Coma, V., Mate, J. I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 2156-2165.