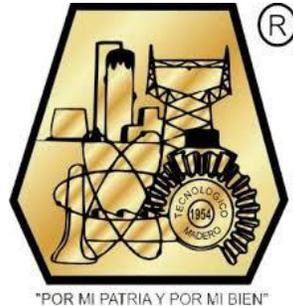


INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD MADERO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA



TESIS

“INFLUENCIA DEL TIPO DE SOLVENTE Y LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE *MELICOCOCCUS BIJUGATUS* SOBRE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS DE QUITOSANO – ALMIDÓN”

Para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

Presenta:
Ing. Mayra Elizabeth Juárez Méndez

Director de tesis
Dra. Nancy Patricia Díaz Zavala

Co-director de tesis
Dra. Jessica Ismalé Lozano Navarro



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Ciudad Madero

"2019: Año del Cardillo del Sur, Emiliano Zapata"

Cd. Madero, Tams., a **23 de Mayo de 2019**

OFICIO No.: UI.142/19
ÁREA: DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN
DE TESIS

ING. MAYRA ELIZABETH JUÁREZ MÉNDEZ
No. DE CONTROL G97070689
P R E S E N T E

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

**"INFLUENCIA DEL TIPO DE SOLVENTE Y LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE MELICOCOCCUS
BIJUGATUS SOBRE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS DE QUITOSANO-ALMIDÓN"**

El Jurado está integrado por los siguientes catedráticos:

PRESIDENTE:	DRA.	NANCY PATRICIA DÍAZ ZAVALA
SECRETARIO:	M.C.	JESSICA ISMALÉ LOZANO NAVARRO
VOCAL:	M.A.I.	JORGE HUMBERTO LUNA DOMÍNGUEZ
SUPLENTE:	DRA.	MARGARITA GARCÍA HERNÁNDEZ
DIRECTOR DE TESIS:	DRA.	NANCY PATRICIA DÍAZ ZAVALA
CO-DIRECTOR DE TESIS:	DRA.	JESSICA ISMALÉ LOZANO NAVARRO

Es muy satisfactorio para la División de Estudios de Posgrado e Investigación compartir con Usted el logro de esta meta. Espero que continúe con éxito su desarrollo profesional y dedique su experiencia e inteligencia en beneficio de México.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
Tecnología y calidad de vida

DR. JOSÉ AARÓN MELO BANDA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



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

c.c.p. Archivo
Minuta

JAMB:MAO



Av. 1^a de Mayo y Sor Juana I. de la Cruz Col. Los Mangos, C.P. 89440, Cd. Madero, Tams.

Tel. 01 (855) 857 49 20, e-mail: dir01_cdmadero@tecn.mx

www.tecn.mx | www.cdmadero.tecn.mx

Dedicatoria

A Dios por haberme permitido haber llegado hasta este punto, por estar conmigo siempre.

A mis padres por darme la vida, en especial a mi madre por confiar en mí, porque nunca me ha dejado sola, acompañándome siempre en todo lo que me he propuesto. A mis hermanos por su apoyo y acompañamiento sin igual.

A mi familia, por todo ese amor que me demuestran cada día, por esa paciencia, porque en los momentos más difíciles durante esta trayectoria me han acompañado.

A mis amigos de siempre y ahora, a todos esos compañeros de clases.

A todas esas personas que en algún momento de mi vida me han ayudado y apoyado de una u otra forma, porque incluso la más pequeña de las acciones ha ayudado a cambiar mi mundo.

Agradecimientos

Al Tecnológico Nacional de México por el proyecto “Influencia del tipo de solvente y la concentración del extracto de *Melicoccus Bijugatus* sobre películas antimicrobianas de Quitosano – Almidón” número 5502.19-P

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de maestría para el proyecto CONACyT infraestructura número: 295494, número de apoyo: 708862.

Especialmente agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Nancy Patricia Díaz Zavala por la confianza depositada en mí, su apoyo, asesorías, por compartir su conocimiento y motivación que me han ayudado a terminar con éxito la maestría.

A mi co-directora Dra. Jessica Ismalé Lozano Navarro por compartir su conocimiento, paciencia, por la motivación, que me han ayudado para terminar con éxito.

A los profesores Dra. Margarita García Hernández y M. A. I. Jorge Humberto Luna Domínguez por ser parte de mi comité tutorial y jurado de examen.

A mi tutora M.P. María Yolanda Chávez Cinco por su apoyo para obtener las hojas y el fruto del *Melicoccus Bijugatus*.

A la maestra Beatriz Imelda Tijerina Ramos por su apoyo en el laboratorio para la obtención de los extractos de hoja, de fruto y realizar los análisis microbiológicos.

Al Dr. Francisco Paraguay Delgado por su apoyo con el análisis termogravimétrico y microscopía electrónica de barrido.

Al Dr. Ricardo García Alamilla por su apoyo con el análisis de infrarrojo.

Al M.C. Josué Francisco Pérez Sánchez por su apoyo con los análisis de Cromatografía de gases.

A mis residentes Martín de Jesús Pérez Rodríguez y María Magdalena Hernández, gracias por su apoyo en mi proyecto de maestría.

Índice General

	Página
Resumen	VII
Abstract	VIII
Objetivos	1
Objetivo general	1
Objetivos específicos	1
Metas	1
Hipótesis	1
Introducción	3
Innovación.	5
Capítulo 1	
1 Marco teórico	6
1.1. Quitosano	6
1.2. Almidón	10
1.3. <i>Melicoccus Bijugatus</i>	11
1.3.1. Ácido acético	14
1.3.2. Ácido fórmico	14
1.3.3. Glicerol	15
1.3.4. Hongos	16
1.3.5. Aislamiento de cepas	16
1.4. Antecedentes	17
Capítulo 2	
2 Metodología experimental	19
2.1. Diseño experimental	19
2.2. Materiales	19
2.3. Obtención del extracto por el método Soxhlet	20
2.4. Síntesis de películas control de quitosano-almidón y películas de ..	21
quitosano – almidón con extracto de hoja y extractor de fruto de	

<i>Melicoccus Bijugatus.</i>	
2.5. Pruebas antimicrobianas	23
2.5.1. Aislamiento de cepas	23
2.5.2. Pruebas de contaminación previa	23
2.5.3. Prueba contra mesofílicos aerobios	23
2.5.4. Prueba contra coliformes totales	24
2.5.5. Prueba contra hongos	24
2.6. Métodos de caracterización	25
2.6.1. Medición de espesor	25
2.6.2. Medición de potencial de hidrogeno (pH)	26
2.6.3. Determinación de color mediante software	26
2.6.4. Propiedades ópticas (transparencia y opacidad)	26
2.6.5. Determinación de capacidad antioxidante de las películas ...	28
2.6.6. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	28
2.6.7. Análisis Termogravimétrico (ATG)	29
2.6.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF)	29
2.6.9. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	29
2.6.10. Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CGEM)	29
2.6.11. Análisis Estadístico	30
Capítulo 3	
3 Resultados y discusión	31
3.1. Características de las películas de quitosano-almidón con ... extracto de hoja y extracto de fruto de <i>Melicoccus Bijugatus.</i>	31
3.2. Pruebas antimicrobianas	32
3.2.1. Pruebas de contaminación previa	33
3.2.2. Pruebas antimicrobianas contra mesofílicos aerobios,	34
coliformes totales y hongos	
3.2.2.1. Cultivo de mesofílicos aerobios	34

3.2.2.2. Cultivo de coliformes totales	36
3.2.2.3. Cultivo de hongos	38
3.3. Medición de espesor	39
3.4. Medición de potencial de hidrógeno (pH)	40
3.5. Propiedades ópticas (transparencia y opacidad)	41
3.6. Determinación de capacidad antioxidante de las películas	42
3.7. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (EITF)	43
3.8. Scanning Electron Microscope (SEM)	44
3.9. Thermogravimetric Analysis (TGA)	53
3.10. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	56
3.11. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (CG – MS)	58
Conclusiones y recomendaciones	65
Referencias	68

Índice de Tablas

Tabla	Descripción	Página
1.1.	Actividad antimicrobiana del quitosano sobre microorganismos contaminantes de alimentos de origen animal.	9
1.2.	Características del limoncillo, <i>Melicoccus Bijugatus</i> .	13
2.1.	Nomenclatura de las películas.	22
3.1.	Evaluación de coloración de películas.	33
3.2.	Resultados de pruebas de contaminación previa	35
3.3.	Resultados de pruebas antimicrobianas de mesofílicos aerobios	37
3.4.	Resultados de pruebas antimicrobianas de coliformes totales	39
3.5.	Resultados de pruebas antimicrobianas de hongos	40
3.6.	Espesor promedio de las películas	41
3.7.	Valores de pH con potenciómetro y con tira reactiva del extracto de hoja, extracto de fruto y películas de quitosano-almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de <i>Melicoccus Bijugatus</i> al día 15	41
3.8.	Valores de % Transmitancia, transparencia y opacidad de las películas	43
3.9.	Capacidad antioxidante de cada película (mg/mg equivalente de ácido gálico)	44
3.10.	Porcentaje de pérdidas de peso	56
3.11.	Composición de extracto de fruto de <i>Melicoccus Bijugatus</i>	60
3.12.	Composición de extracto de hoja de <i>Melicoccus Bijugatus</i>	62
3.13.	Composición de película de quitosano – almidón QAfF10	64
3.14.	Composición de película de quitosano- almidón QAfH10	65

Índice de Figuras

Figura	Descripción	Página
1.1	Estructura química del quitosano.	7
1.2	Distribución natural y naturalización aproximados del limoncillo, <i>Melicoccus Bijugatus</i> .	11
1.3	<i>Melicoccus Bijugatus</i> .	12
1.4	Estructura del ácido acético.	14
1.5	Estructura del ácido fórmico.	15
1.6	Estructura del glicerol.	16
1.7	Esquema de la interacción entre los grupos funcionales de quitosano y almidón en la formación de la película.	17
2.1	Dispositivo de extracción Soxhlet.	21
2.2	Puntos de medición de espesor.	26
2.3	Espectrofotómetro UV-Vis marca GBC modelo Cintra 303.	27
3.1	Coloración de películas (a) QAa, (b) QAf, (c) QAaH0.5, (d) QAaH5, (e) QAaH10, (f) QAfH0.5, (g) QAfH5, (h) QAfH10, (i) QAaF0.5, (j) QAaF5, (k) QAaF10, (l) QAaF0.5, (m) QAfF5 y (n) QAfF10.	33
3.2	Medios de cultivo de a) agar para método estándar, b) agar dextrosa – papa, c) agar bilis rojo violeta y d) placas con medio de cultivo.	34
3.3	Prueba de contaminación previa con agar para método estándar.	35
3.4	Medios de cultivo con cepas a) Mesofílicos aerobios, b) coliformes totales, c) hongos.	36
3.5	Prueba antimicrobiana contra mesofílicos aerobios de las películas a) QAaH5, b) QAaF10, c) QAfH5 y d) QAfH10.	36
3.6	Prueba antimicrobiana de coliformes totales.	38
3.7	Prueba antimicrobiana de hongos.	39
3.8	Curva de calibración de ácido gálico.	44
3.9	Espectro EITF comparativo de QAa, QAf, QAaH10, QAfH10, QAaF10 y QAfF10.	45
3.10	Micrografías de la película de quitosano – almidón QAa a diferentes magnificaciones: a) 500x, b) 750x y c) 1500x.	47
3.11	Micrografías de película quitosano – almidón QAf a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.	48
3.12	Micrografías de película quitosano – almidón QAaF10 a diferentes magnificaciones: a)	49

	300x, b) 700x y c) 1700x.	
3.13	Micrografías de película quitosano – almidón QAaH10 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.	51
3.14	Micrografías de película quitosano – almidón QAF10 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.	52
3.15	Micrografías de película quitosano – almidón QAFH0.5 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.	53
3.16	Micrografías de película quitosano – almidón QAFH5 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.	55
3.17	Termogramas de las películas QAa, QAF, QAaF10, QAaH10, QAFH0.5, QAF5 y QAF10.	56
3.18	Espectro ¹ H RMN de extracto de hoja de <i>Melicoccus Bijugatus</i> .	57
3.19	Espectro ¹ H RMN de extracto de fruto de <i>Melicoccus Bijugatus</i> .	58
3.20	Cromatograma de extracto de fruto de <i>Melicoccus Bijugatus</i> .	59
3.21	Cromatograma de extracto de hoja de <i>Melicoccus Bijugatus</i> .	61
3.22	Cromatograma de extracto de película de quitosano – almidón QAF10.	63
3.23	Cromatograma de extracto de película de quitosano – almidón QAFH10.	64

Resumen

Este estudio consistió en sintetizar y caracterizar películas de quitosano – almidón con extracto de *Melicoccus Bijugatus* evaluando el tipo de solvente y la parte de la planta utilizados. El extracto de hoja y de fruto del *Melicoccus Bijugatus* se obtuvo por medio del método Soxhlet. Las películas fueron elaboradas con ácido acético y ácido fórmico sin extracto para usarlas como referencia y con extracto al 0.5, 5 y 10%. Las películas sin extracto elaboradas con ácido acético resultaron traslúcidas, flexibles con coloración amarillenta siendo más intensa en las elaboradas con ácido fórmico. Las películas de quitosano – almidón elaboradas con ácido acético y extracto de hoja presentaron una coloración verde claro atribuida a la clorofila mientras que en las películas con extracto de fruto fue percibida una coloración naranja claro atribuida a la composición fenólica, en especial a la naringenina; ambas son traslúcidas, flexibles y conforme va aumentando la concentración se presentó un aumento del espesor, lo que las hizo menos flexibles y opacas, las películas elaboradas con ácido fórmico adquieren estas mismas características, pero con una coloración más intensa. En las pruebas de contaminación previa, se concluyó que en la mayoría de los casos mejoró de manera notable la tolerancia a los microorganismos ambientales con respecto a la película de referencia, sin embargo, para realizar las pruebas antimicrobianas se realizó un proceso de pasteurización previa. En las pruebas antimicrobianas se observó que las películas con mejores resultados son: **QAfH5** y **QAfH10**. Las películas se sometieron a pruebas físicas de espesor, pH, propiedades ópticas (transparencia y opacidad), Espectroscopía Ultravioleta – visible (UV – vis), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Análisis Termogravimétrico (ATG), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CGEM).

Abstract:

This study consisted of synthesizing and characterizing chitosan-starch films with *Melicoccus Bijugatus* extract, evaluating the type of solvent and the part of the plant that was used. The leaf and fruit extract of *Melicoccus Bijugatus* was obtained by the Soxhlet method. The films were elaborated with acetic acid and formic acid without extract to be used as reference and with 0.5, 5 and 10% extract. The films without extract elaborated with acetic acid turned out to be translucent, flexible with yellowish coloration being more intense in those elaborated with formic acid. The chitosan-starch films made with acetic acid and leaf extract showed a light green color attributed to chlorophyll, while in the films with fruit extract a light orange color attributed to the phenolic composition, especially naringenin, was perceived; both are translucent, flexible and as the concentration increases, there was an increase in thickness, which made them less opaque, the films made with formic acid acquire these same characteristics, but with a more intense coloration. In the previous contamination tests, it was concluded that in most cases the tolerance to environmental microorganisms with respect to the reference film was significantly improved, however, to carry out the antimicrobial tests, a prior pasteurization process was carried out. In the antimicrobial tests it was observed that the films with the best results are: **QafH5** and **QafH10**. The films were subjected to physical tests of thickness, pH, optical properties (transparency and opacity), Ultraviolet-visible Spectroscopy (UV-vis), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (ATG), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (EITF), Nuclear Magnetic Resonance (RMN), Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CGEM).

Objetivos.

Objetivo general.

Se elaboraron películas delgadas a partir de Quitosano – Almidón con efecto antimicrobiano al integrar extracto de hoja y extracto de fruto del Limoncillo (*Melicoccus bijugatus*) observando la influencia del tipo de solvente y la concentración del extracto.

Objetivos específicos.

- ❖ Obtener el extracto de limoncillo (*Melicoccus Bijugatus*) por medio del método de extracción Soxhlet.
- ❖ Sintetizar películas de quitosano almidón, agregando extracto de limoncillo en cantidades de 0.5, 5 y 10 % (v/v).
- ❖ Realizar pruebas de contaminación previa y antimicrobiana a las películas contra diversos microorganismos tales como bacterias mesofílicas aerobias, coliformes totales y hongos.
- ❖ Realizar pruebas físicas de espesor, pH, propiedades ópticas (transparencia y opacidad), Espectroscopía Ultravioleta – visible (UV – vis), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Análisis Termogravimétrico (ATG), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas (CGEM).

Metas

- ❖ Obtener el grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Química.
- ❖ Asistir a un congreso nacional / internacional.
- ❖ Publicar un artículo en una revista arbitrada o indizada.

Hipótesis

El uso de un solvente con un bajo número de carbonos para disolver el quitosano, potencia el efecto antimicrobiano del mismo. La adición del extracto de hoja y extracto de fruto del limoncillo (*Melicoccus Bijugatus*), por su alto contenido fenólico, mejora considerablemente el efecto antimicrobiano así como diversas propiedades de las películas de quitosano-almidón. Con

las pruebas de caracterización se espera observar la influencia en el espesor, en el pH, en las propiedades ópticas (transparencia y opacidad), la capacidad antioxidante, morfología, estabilidad térmica y grupos funcionales del extracto en la actividad antimicrobiana de las películas.

Introducción

Actualmente para obtener recubrimientos más eficientes, se recurre a la mezcla de dos o más polímeros formadores de películas con el objeto de aprovechar las distintas características funcionales de cada uno de los componentes. Algunos trabajos de investigación han reportado recubrimientos compuestos de quitosano – almidón de arroz [1] y quitosano – almidón de maíz [2], al aplicar estos recubrimientos se buscan fusionar las mejores características de estos materiales. Para optimizar las propiedades mecánicas de las películas como deformación, resistencia a la ruptura, adhesividad y de barrera, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha evaluado la adición de otros biopolímeros como almidón de papa [3], harina de arroz y harina de plátano [4].

El quitosano es un copolímero compuesto de unidades de 2-acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)-Glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi- β -D-Glucopiranososa [5]. Su principal fuente es la quitina, la cual es sometida a un proceso de desacetilación en un medio alcalino, las condiciones de temperatura, presión, concentración y tiempo determinan el peso molecular del polímero y su grado de desacetilación.

Se ha mostrado una gran actividad antimicrobiana del quitosano, contra una amplia variedad de microorganismos patógenos y alterantes, incluyendo hongos, y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [6].

Para las aplicaciones tanto de envasado como de recubrimiento, el control de permeabilidad al agua y a gases (oxígeno y dióxido de carbono) son características que tienen mucha influencia en la estabilidad de los alimentos durante el almacenamiento [7]. Por lo que se utiliza exitosamente como empaque ya que estas películas son transparentes, durables, flexibles y difíciles de romper.

El almidón es el segundo biopolímero más abundante y la materia prima más usada en la elaboración de películas biodegradables, debido a que tiene buenas propiedades mecánicas, es hidrosoluble, intrínsecamente antiestática, renovable, abundante y versátil ya que se puede modificar químicamente. Se usan principalmente para disminuir el intercambio gaseoso ya que actúa como barrera a gases como el CO₂ y O₂; así como de aromas entre el medio ambiente y el alimento [8]. El carácter hidrofílico de estas películas les confiere un aspecto quebradizo causado

por altas fuerzas intermoleculares, empleándose plastificantes como el glicerol, para aumentar la flexibilidad de las películas debido a su capacidad de reducir los enlaces de hidrógeno internos entre las cadenas de los polímeros mientras aumentan el espacio molecular.

Los agentes antimicrobianos naturales derivados de fuentes tales como los extractos de plantas, han sido reconocidos y utilizados durante siglos. Sin embargo, en los últimos años la investigación acerca de las propiedades antimicrobianas de estas sustancias ha aumentado.

Los extractos consisten en la fracción no volátil de los principios activos, es decir, aquellos que por no ser volatilizables o ser inestables con la temperatura, no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción como son: HPLC, extracción en fluidos supercríticos, arrastre de vapor, extracción por solución, extracción por centrifugación.

Contribución de la investigación

En este trabajo de investigación se buscó evaluar la influencia del tipo de solvente y la concentración del extracto de hoja y extracto de fruto del *Melicoccus Bijugatus* (debido al contenido fenólico encontrado en estos extractos), sobre películas de quitosano - almidón en la inhibición de bacterias y hongos (Mesofílicos aerobios, coliformes totales y colonias de hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (blanco), *Penicillium digitatum* (verde) y *Aspergillus Niger* (negro), se sabe que los fenoles, son potentes antimicrobianos y no se ha demostrado hasta este momento que esta sustancia produzca efectos cancerígenos sobre seres vivos, esto haría finalmente del empleo de los extractos como uno de los métodos antimicrobianos más seguros. Se realizaron pruebas físicas de espesor, pH, propiedades ópticas (transparencia y opacidad), Espectroscopía Ultravioleta – visible (UV – vis), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Análisis Termogravimétrico (ATG), Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de masas (CGEM). Obteniendo en películas elaboradas con ácido fórmico y extracto de hoja en concentraciones de 5 y 10%, un mayor efecto antimicrobiano, mostrando una coloración y rigidez intensa en comparación con las películas elaboradas con ácido acético así mismo estas películas. En la caracterización de MEB presentaron un aspecto superficial no liso, asociada al ácido fórmico.

Innovación.

El limoncillo es un fruto sobre el que comienza a investigarse al respecto y los resultados obtenidos han demostrado que este fruto tiene propiedades antibacterianas. Hasta el momento no hay publicaciones donde se analice el efecto antimicrobiano combinado del limoncillo y sabiendo de sus propiedades se busca mezclarlo con un componente ya demostrado como antimicrobiano como es el quitosano.

Capítulo 1.- Marco Teórico.

1.1. Quitosano

El quitosano es un heteropolisacárido que se encuentra en casi un tercio del total de la pared celular de algunos hongos [9] e insectos y en el caparazón de los crustáceos. Sin embargo su principal fuente de obtención es mediante la desacetilación alcalina de la quitina [10].

Es uno de los pocos polisacáridos catiónicos naturales, considerado no tóxico y como un polímero biológicamente compatible con los seres vivos [5].

Para cualquier polímero, la solubilidad y la viscosidad dependen de su peso molecular (M_w), pero para el quitosano su efecto se extiende a sus propiedades biológicas, por lo que la determinación de su masa atómica adquiere una gran importancia, esto debido a que le confieren al polímero capacidad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante. Si se logra conocer el peso molecular y la conformación de las moléculas del biopolímero, se pueden estimar una gran cantidad de propiedades reológicas y mecánicas, como su coeficiente de fricción y de sedimentación [11]. En este proyecto se usó el quitosano de peso molecular medio de la marca Sigma Aldrich.

El contenido de nitrógeno del quitosano es aproximadamente del 6.89 %, el grupo amino libre en la estructura del quitosano le proporciona un comportamiento marcadamente básico, además le confiere ciertas características fisicoquímicas de gran interés industrial tales como biodegradabilidad y biocompatible [10].

Sus grupos amino permiten que se solubilice fácilmente en medios ácidos, confiriéndole una innumerable cantidad de aplicaciones, como recubrimiento de semillas, sistemas liberadores de fertilizantes, agente bactericida y fungicida para la protección de plántulas en la agricultura, se usa en la producción de suturas quirúrgicas, en la producción de gasas y vendajes, cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras en la medicina, como coagulante primario para aguas residuales, como floculante para la remoción de coloidales sólidas y aceites de pescado, captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas en tratamiento de aguas, en la fabricación de cápsulas para adelgazar, como aditivo bactericida en jabones, shampoos, cremas

de afeitar, cremas para la piel, pasta dental, etc., agente hidratante para la piel en cosméticos, y como biosensores para glucosa en sangre humana y para la detección de fenoles en aguas de desecho en plantas industriales [12]. También es útil en el tratamiento de aguas, usado como coagulante eficaz para el tratamiento de agua para consumo humano, dado que presenta resultados de remoción para turbidez que superan el 96 % [13].

Es normalmente soluble a un pH menor de 6 y los factores que se deben tener en cuenta cuando se solubiliza son, el grado de desacetilación y la distribución de los grupos acetilo y amino a lo largo de la cadena. El grado de ionización es importante también y generalmente el quitosano se disuelve alrededor de un valor de 0.5 [14].

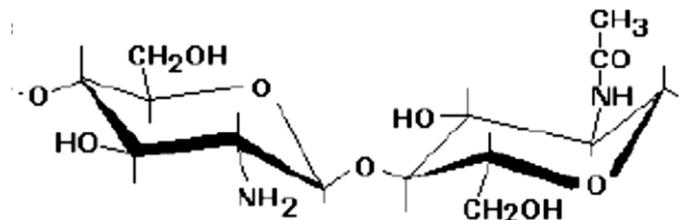


Figura 1.1 Estructura química del quitosano [12].

Las soluciones de quitosano con alto grado de desacetilación muestran grandes cambios en la permeabilidad media del vapor de agua (WVP), la resistencia a la tracción de películas (TS), elongación (E), y materia total soluble (TSM) debido al tipo de pH y ácido que hizo el bajo grado de desacetilación.

Los sistemas de solvente de quitosano – ácido acético muestran baja permeabilidad media del vapor de agua (WVP), y alta integridad, altos valores de materia total soluble (TSM), y bajos valores de elongación (E) y materia total soluble (TSM) comparado con otros ácidos orgánicos [15]. De obligado conocimiento para la caracterización de este polímero, ya que influyen sobre sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y funcionalidad [16].

El mejor solvente para solubilizar el quitosano es el ácido fórmico, el más utilizado es el ácido acético ya que no se observan variaciones en la estructura de las películas, también es soluble en ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido cítrico, es insoluble en ácido sulfúrico y fosfórico [17][18].

El quitosano como agente antimicrobiano presenta varias ventajas sobre otros tipos de envases activos, ya que posee una mayor actividad antibacteriana, un espectro de acción más amplio, una tasa de inhibición mayor, y menor toxicidad para las células de mamíferos [19].

Debido a su amplio espectro de acción, ya sea en forma de solución, película comestible, polvo agregado directamente en la preparación de alimentos procesados u otras formulaciones, se ha utilizado como preservante en la industria de alimentos de origen animal, en donde se aprecia que el quitosano es capaz de inhibir y/o disminuir el crecimiento de los principales microorganismos patógenos de alimentos de origen animal.

En este contexto el quitosano posee propiedades únicas que lo hacen un ingrediente ideal para el desarrollo de películas comestibles y su aplicación en sistemas alimentarios como agente antimicrobiano, ya que presenta una baja toxicidad, con un DL50 = 16 ml/kg, valor que sitúa al quitosano en un nivel similar a la azúcar y lo hace menos tóxico que la sal [20].

El quitosano muestra diferentes propiedades de película cuando se usan diferentes solventes y grados de desacetilación para preparar las soluciones formadoras de películas.

Las películas de quitosano son bioadherentes [21], altamente biocompatibles [22] transparentes e incoloras [23][24].

Por tanto, debido a la abundancia, versatilidad y facilidad de aplicación del quitosano, este biopolímero se convierte en un compuesto prometedor para su aplicación como agente antimicrobiano en alimentos.

En general se reconoce que levaduras y mohos son los microorganismos más sensible al quitosano, seguido por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [25].

Las películas de quitosano han demostrado tener un efecto antimicrobiano de amplio espectro, que ha sido explicado a través de varios mecanismos de acción, contra microorganismos que comúnmente contaminan alimentos de origen animal como bacterias del tipo *Escherichia Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, entre la principales, identificadas como los más potentes patógenos asociados con enfermedades alimentarias [26][27].

Las propiedades antimicrobianas de soluciones y películas de quitosano reportan en varios estudios, una gran capacidad de disminuir la multiplicación de una amplia variedad de bacterias principalmente, presentes en alimentos de origen animal (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Actividad antimicrobiana del quitosano sobre microorganismos contaminantes de alimentos de origen animal.

Microorganismo	Alimento	Referencia
Bacterias		
Coliformes	Carne de vacuno Queso mozzarella	Darmadji y Izumimoto (1994) Altieriet al. (2005)
<i>Escherichia Coli</i>	Carne de vacuno Salchichas Carne de cerdo Tocino y kebabs de cordero Filete de bacalao Huevos	Darmadji y Izumimoto (1994) Park et al. (1999), Younet al. (2000, 2001) Lee et al. (2003) Raoet al. (2005) Gómez-Estaca et al. (2010) Leleuet al. (2011)
<i>Escherichia Coli</i> <i>O157</i>	Jugo de pollo	Lahmeret al. (2012)
<i>Gram-positivas</i> y <i>Gram negativas</i>	Carne de cordero y salami	Kanattet al. (2008)

Además de su acción antimicrobiana en alimentos, se ha descrito su acción in vitro sobre patógenos contaminantes de productos cárnicos y cecinas mencionando entre los principales: *Escherichia Coli* O157:H7 [28], causante de graves complicaciones como la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemorrágico, y que su mayor fuente de infección son los alimentos de origen animal, principalmente carne de vacuno molida y leche cruda [29][31].

Sin embargo, hay otros autores que describen resultados diferentes, debido a que la actividad antimicrobiana del quitosano y su concentración mínima inhibitoria varía considerablemente con el tipo de quitosano (α , β -quitosano), grado de desacetilación [32], peso molecular [33][34], organismo blanco y las condiciones del medio en el que se aplica, particularmente pH, fuerza iónica y presencia de solutos susceptibles de reaccionar con quitosano a través de interacciones

intermoleculares, que puedan bloquear parcial o completamente la reactividad del grupo amino activo [35].

1.2. Almidón

El almidón se encuentra entre los polímeros más abundantes, solo superado por la celulosa y la quitina. Es el principal carbohidrato de almacenamiento de energía de las plantas como cereales, leguminosas y tubérculos [36][37]. Debido a su disponibilidad, biodegradabilidad y bajo costo, el almidón puede ser utilizado en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y del papel [38].

El almidón de arroz presenta bajos contenidos de grasa, fibra cruda y proteína lo que lo convierte en sustituto ideal para ser aplicados en jarabes y pastas. Al igual que presenta altas temperaturas de gelatinización. Presenta porcentaje de absorción de agua, poder de hinchamiento y capacidad de rehidratación lo que lo convierte en una materia prima que podría ser empleado en productos que requieran retener agua y en preparaciones que necesiten un buen poder de rehidratación como el caso de productos liofilizados en polvo y/o instantáneos.

Al igual presenta una mejor estabilidad a la refrigeración en relación con la exudación de agua (sinéresis) por lo cual puede ser empleado como agente espesante. Finalmente, presenta un menor grado de retrogradación por lo que puede ser empleado en formulaciones donde se requiera un bajo poder de dureza en el almacenamiento [39].

El almidón de arroz consta de una molécula que tiene dos polisacáridos que son generalmente el 20% es amilosa y el 80% amilopectina, cuya proporción influye notablemente en las propiedades y usos de este material. También contiene altas cantidades de ácido glutámico, ácido aspártico, y pequeñas cantidades de lisina [40].

Para mejorar estos inconvenientes y proporcionar mejores propiedades funcionales, usualmente, el almidón es combinado con otros polímeros naturales para formar películas. Debido a su capacidad formadora de películas, biocompatibilidad y actividad antibacteriana, el quitosano es utilizado para este propósito [41].

1.3. *Melicoccus Bijugatus*

El *Melicoccus Bijugatus* también es conocido como quenepa, genip (inglés), quenette (francés), y comúnmente en México como lima española, limoncillo o guaya, es nativo de la zona norte de América del Sur, y se ha cultivado y naturalizado extensamente a través de los trópicos (Figura 1.2). La madera es útil en la manufactura de muebles y molduras. El área de distribución natural original de la guaya o limoncillo se encuentra en Colombia, Venezuela y las Guayanas. Se ha naturalizado por medio del cultivo a través de las indias occidentales, en el sureste de México, América central, gran parte de América del sur tropical y las islas Galápagos. También se cultiva en las áreas más cálidas de las zonas templadas, tales como el sur de la Florida y California.

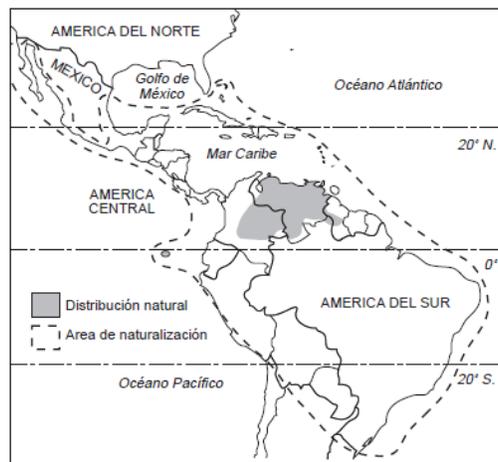


Figura 1.2 Distribución natural y de naturalización aproximados del limoncillo, *Melicoccus Bijugatus*.

Las flores blanco verduzcas, fragantes y pequeñas aparecen en agrupaciones (en forma de panícula, florescencia racimosa) al final de la rama. La florescencia tiene lugar de abril a mayo y las frutas maduran en junio extendiéndose hasta septiembre, las frutas (drupas), las cuales crecen en agrupaciones, tienen un exocarpo (el exterior) coriáceo de color verde o amarillo verduzco, contienen una y ocasionalmente dos semillas grandes, cada una cubierta de fibras y una capa (la porción comestible) de color salmón y gelatinosa. Se reproducen por medio de las semillas y por medio de injertos [42]. Los extractos de semillas, tallos y hojas han sido evaluados mediante pruebas de análisis de determinación de fenoles totales, actividad de búsqueda de radicales libres, análisis de azúcar usando Cromatografía de Gases y análisis antimicrobiano contra bacterias *Gram-positivas*, *Gram-negativas*, levaduras, *Pseudomona Aeruginosa*, *Bacilus Cereus*,

Staphylococcus Aureus, *Escherichia Coli* y *Candida Albicans*, en pulpa y semillas, encontrándose en el tejido de las semillas y pulpa una alta actividad de radicales libres, fenoles totales, y actividad antimicrobiana [43].

Melicoccus Bijugatus Jacq., es un árbol dicotiledóneo de la familia de las sapindáceas también conocida como familia de la sapindus. Los frutos de *Melicoccus Bijugatus* (Figura 1.3) están relacionadas con las especies de frutas asiáticas más comúnmente conocidas como longan (*Dimocarpus Longan Lam*), litchi (*Litchi Chinensis L.*) y rambutam (*Nephelium Lappaceum L*); [44]. A pesar de que las frutas se consumen con fines médicos y dietéticos, la investigación sobre la fitoquímica de la fruta, especialmente los metabolitos secundarios y sus actividades biológicas asociadas, es casi inexistente.

Tanto los fenoles como los azúcares se han investigado debido a la prevalencia de estos tipos de compuestos en las frutas.



Figura 1.3. *Melicoccus Bijugatus*.

Tabla 1.2 Características del limoncillo, *Melicoccus Bijugatus*.

Nombre común	Guaya, guaya, guayum, maco, quenepa, papamundo o limoncillo.
Tipo	Árbol frutal
Familia	Sapindáceas
Origen	Natural de la zona intertropical de América
Clima	Climas secos o húmedos con precipitaciones de 750 a 2500 mm, y requiere una estación seca marcada para florecer y producir de manera satisfactoria.
Suelo	Crece en una amplia variedad de suelos, pero prefiere suelos profundos, fértiles, de origen calcáreo. Prospera incluso en suelos empobrecidos.
Altura máxima	30 metros de altura.
Fruto	Drupa redonda de 2-4 cm de diámetro de cascara verde delgada y quebradiza principalmente en su temporada de maduración y se agrupan en grandes ramos de hasta 10cm de longitud.
Usos	El uso principal son sus frutos, que se consumen frescos o se hacen conservas y frutas enlatadas, principalmente en América Central y del Sur. En Colombia y Venezuela, por ejemplo, se consume fresco e incluso se utiliza para preparar bebidas refrescantes enlatadas.
Multiplicación	Semillas.
Hojas	Hojas alternas en forma de espiral, de 8 a 12 cm de longitud las superiores y 3 a 6 cm las inferiores, planadas, con 4 a 6 folíolos opuestos de unos 5 a 10 cm de longitud cada uno.
Características especiales	El árbol es hospedero de la mosca negra de los cítricos (<i>Aleurocanthus Woglum</i>), pero varios parasitoides (<i>Prospaltella Spp</i> , <i>Eretmocerus Serius</i> , <i>Amirus Hesperidium</i>) proporcionan un control efectivo de esta plaga.

Un extracto es una disolución de los principios activos de una planta en un determinado medio que actúa de disolvente. En todos los extractos hay un mínimo de principios activos. Dependiendo de la planta con la que esté hecho tendrá unos beneficios u otros.

Para elaborar los extractos se puede utilizar la planta al completo o las partes que tienen más concentración de principios activos. Para extraerlos se usan métodos con calor o en frío.

Las principales diferencias entre tipos de extractos vegetales se dan por el medio en el que están disueltos. Según esta clasificación podemos encontrar extractos glicólicos, hidroalcohólicos o tinturas y oleosos [21].

1.3.1. Ácido acético

El ácido acético (Figura 1.4) es un líquido incoloro como el agua, con olor penetrante y que irrita la piel. A 16.75 °C se solidifica, adquiriendo un aspecto similar al hielo, por lo que el ácido acético anhidro puro se llama también acético glacial. Toda vez que no aumenta de volumen al solidificarse, puede guardarse sin cuidado en recipientes que hayan de soportar bajas temperaturas. El ácido acético ebulle a 118.1 °C. Su densidad a 20 °C es 1.05 g/cm³. El anhidro acético es también un líquido incoloro, de olor muy penetrante, que provoca inmediatamente el lagrimeo y origina ampollas sobre la piel. Su punto de ebullición es de 136 °C. Es difícilmente soluble en agua, pero reacciona con ella después de un tiempo y da lugar al ácido acético.

Una gran parte del ácido acético se emplea en las industrias alimenticias, en forma de esencia de vinagre (ácido acético al 80%) y se usa para conservar frutos, pescados, etc. Además se emplea en un gran número de síntesis orgánicas, como la obtención de la aspirina, de colorantes, del ácido cloro acético, etc. [45].

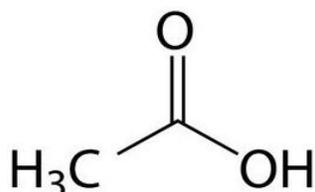


Figura 1.4 Estructura del ácido acético.

1.3.2. Ácido fórmico

El ácido fórmico (Figura 1.5) es un ácido orgánico de un solo átomo de carbono, lo que lo convierte en el ácido orgánico más simple de todos. El término fórmico, proviene del latín fórmica, que significa hormiga. Este químico se puede encontrar en la naturaleza como puede ser en muchas plantas, animales e insectos, tal es el caso de la hormiga.

El ácido fórmico fue aislado por primera vez en 1671 por el naturalista inglés John Ray. Básicamente lo obtuvo machando un montón de hormigas rojas, para posteriormente, destilar el líquido. Actualmente este químico es obtenido de otra manera, es derivado del monóxido de carbono.

Este químico se presenta en forma líquida, es incoloro y tiene un olor picante. También, es soluble en agua ya que su cadena carbonada es muy corta y fácilmente ionizable.

El ácido fórmico es un agente mutágeno químico, es decir, es un compuesto químico que es capaz de alterar las estructuras del ADN de manera brusca. El ácido fórmico ebulle a 101 ° C. su densidad es de 1218.3 Kg/m³ [46].

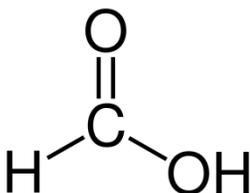


Figura 1.5 Estructura del ácido fórmico.

1.3.3. Glicerol

El glicerol (Figura 1.6) es un polihidroxialcohol ampliamente utilizado en las industrias química, farmacéutica y cosmética en virtud de sus propiedades humectantes, antisépticas, higroscópicas y espesantes.

Se trata de un líquido incoloro, viscoso y casi inodoro, que posee una temperatura de ebullición de 290 °C y una temperatura de fusión de 17.9 °C. Su fuerza de tensión superficial es menor que la del agua, pero mayor que la de muchos disolventes orgánicos; es soluble en agua y alcohol e insoluble en éter y cloroformo. El glicerol puede ser obtenido de lípidos complejos, por síntesis

orgánicas, mediante la fermentación de los carbohidratos o a partir de derivados sintéticos resultantes de la refinación del petróleo [47].

Desde los últimos años de la década de los 40 y debido al descubrimiento de los surfactantes sintéticos, el glicerol ha sido producido a partir de epiclorohidrina obtenida del propileno (y éste a su vez de combustible fósil) [48]. Se agrega una pequeña cantidad de glicerol a las películas con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera y mecánicas. El glicerol actúa como plastificante para incrementar la flexibilidad del producto [49].

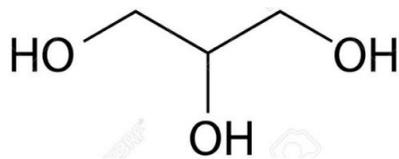


Figura 1.6 Estructura del glicerol.

1.3.4. Bacterias, hongos y levaduras.

Debido al crecimiento lento y baja competitividad, los hongos se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a la irradiación. Por lo tanto pueden ser un problema potencial en alimentos lácteos fermentados, frutas, bebidas de frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales y sus derivados y alimentos de humedad intermedia como las mermeladas, cajetas, especias, etc.

La sobrevivencia de los hongos y levaduras a pH ácidos se pone de manifiesto al inocularlos en el medio de cultivo acidificado a un pH de 3.5. Así mismo, la acidificación permite la eliminación de la mayoría de las bacterias. Finalmente, las condiciones de aerobiosis y la incubación a una temperatura de 25 ± 1 ° C dan como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

1.3.5. Aislamiento de cepas

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus

propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos puros.

Un cultivo puro es aquel que contiene un solo tipo de microorganismo y que procede generalmente de una célula; el crecimiento de ésta origina, en un medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia.

Para obtener cultivos puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento, que fueron desarrolladas durante el siglo XIX [50].

1.4. Antecedentes.

Lozano y col. (2017), en su investigación encontraron que las películas elaboradas con extractos que contienen antioxidantes tales como antocianinas, betalainas, timol, carvacrol y resveratrol, mejoraron ciertas propiedades y mostraron actividad antimicrobiana contra que microorganismos en pruebas de inhibición de crecimiento de mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos, en las pruebas de pH, medición de espesor, pruebas de propiedades ópticas como transparencia y opacidad, análisis mecánico dinámico y temperatura de transición vítrea mostrando una mejor actividad antimicrobiana que las películas usadas como referencia sin ser necesaria la previa esterilización de los materiales [1]. Lozano y col. (2018), analizaron las propiedades de la misma serie de películas elaboradas con extractos con extractos naturales [51].

Liu y col. (2009) [52] reportaron un estudio con películas elaboradas con almidón de maíz y quitosano mostrando que la mezcla entre estos dos polisacáridos mejora sus propiedades como la permeabilidad al vapor de agua y la elongación, en contraste con películas desarrolladas con solo uno de los componentes estructurales. Estos dos polisacáridos interactúan a través de sus grupos funcionales mediante puentes de hidrógeno para la formación de películas adicionadas con glicerol como plastificante (Figura 1.7).

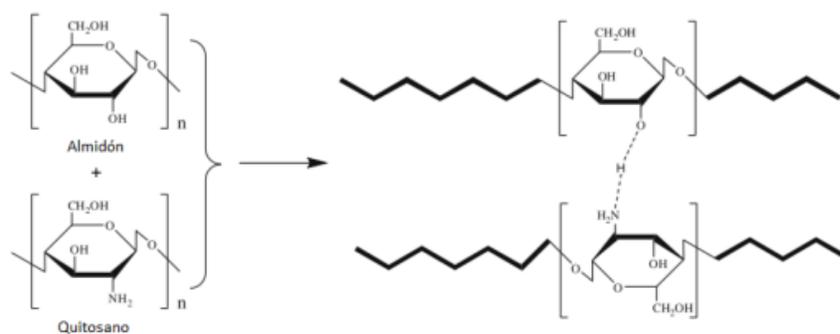


Figura 1.7 Esquema de la interacción entre los grupos funcionales de quitosano y almidón en la formación de películas [52].

Romero y col. (2011), evaluaron la actividad antibacteriana, microestructura, propiedades mecánicas y de barrera de películas de almidón de plátano en dos cepas de bacterias, determinando la solubilidad, las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua [53] Sánchez y col. (2012), elaboraron y caracterizaron películas de almidón de yuca [54], López y col. (2018), elaboraron películas biodegradables de almidón de maíz termoplástico y [55] y Lozano y col. (2017) (2018), realizaron pruebas antimicrobianas, ópticas y mecánicas a películas de quitosano y almidón de arroz con extractos naturales y encontraron que estos polímeros combinados con los extractos efectivamente inhiben o reducen el crecimiento de microorganismos del contacto humano y ambiental, la presencia de los extractos disminuyó los porcentajes de transmitancia, así como los valores de transparencia, al tiempo que aumentaron sus valores de opacidad, proporcionando mejores propiedades de barrera a la luz UV-vis [1][51].

Park y col., (2002) [24] prepararon películas de quitosano utilizando tres pesos moleculares diferentes y cuatro disolventes de ácido orgánico sin plastificante, encontraron que las propiedades mecánicas y de barrera de películas de las películas pueden ser controladas a través de la elección molecular adecuada peso del quitosano y solvente. Las películas con propiedades adaptadas que pueden ser útiles en la alimentación, embalaje y aplicaciones médicas.

Kim y col., (2006) [15] reportaron la investigación de dos tipos de quitosanos con diferente grado de desacetilación disolviéndolos en ácido fórmico, ácido acético, láctico y propiónico para preparar películas de quitosano.

El quitosano mostró diferentes propiedades de la película con los diferentes solventes y grados de desacetilación que fueron utilizados para preparar películas. Observando que a medida que aumentaba el pH y permeabilidad al vapor de agua de las películas de quitosano tendían a disminuir, mientras que la resistencia a la tracción aumentaba significativamente.

Bystrom y col. (2008), caracterizaron los fenoles en el fruto por medio de las técnicas de Espectroscopía Ultravioleta – visible (UV – vis), Cromatografía de líquidos por matriz de fotodiodos (CLMF), Cromatografía de líquidos acoplado a Espectrometría de Masas (CLEM) [56], Bystrom y col. (2009), investigaron sobre la actividad fenólica, de azúcares, antimicrobiana y radicales libres en fruta, encontrando altos índices de polifenoles en la pulpa del fruto por medio de pruebas como Espectroscopía Ultravioleta – visible UV – vis, Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas (CGEM), actividad antimicrobiana y Resonancia magnética nuclear (RMN) [43]. Bystrom y col. (2012), investigaron sobre los posibles efectos en la salud de la fruta del *Melicoccus Bijugatus* mediante la realización de pruebas fitoquímicas y etnobotánicas, confirmando la presencia de los polifenoles como el ácido cumárico y catequinas [57].

Danis y col. (2016) realizaron la evaluación fitoquímica de las hojas encontrando índices más altos de polifenoles en los extractos de las hojas que en los extractos de fruto encontrados por Bystrom en el 2009 [58].

Capítulo 2.- Metodología experimental.

Este trabajo se desarrolló en los laboratorios de síntesis del Centro de Investigación en Petroquímica así como en el Laboratorio de Alimentos, perteneciente al Tecnológico Nacional de México – Instituto Tecnológico de Ciudad Madero.

La caracterización térmica y morfológica se desarrolló en el laboratorio del Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMA), Chihuahua.

A continuación, se indican los materiales usados durante la síntesis y la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas así como la metodología que se siguió en las diversas técnicas de caracterización utilizadas.

2.1. Diseño experimental.

La parte experimental de este trabajo se dividió en tres partes:

1. Obtención del extracto de hoja y fruto de *Melicoccus Bijugatus*, y síntesis de las películas.
2. Aislamiento de cepas, realización de pruebas de contaminación previa y pruebas antimicrobianas.
3. Caracterización de las películas mediante medición de espesor, medición de potencial de hidrógeno, Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (EITF), Espectroscopía Ultravioleta – Visible (UV - Vis), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Análisis Termogravimétrico (ATG), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CGEM).

2.2. Materiales:

Para la obtención del extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* se ocupó el siguiente reactivo:

Reactivo
Etanol pureza mínima 99.7 % marca Fermont

Para la síntesis de películas de quitosano-almidón con extracto de *Melicoccus Bijugatus* se ocuparon los reactivos que se enlistan a continuación:

Reactivo
Quitosano 85% desacetilado peso molecular medio marca Sigma-Aldrich.
Almidón de arroz marca Sigma – Aldrich.
Ácido acético glacial al 100% marca Fermont.
Ácido fórmico al 95% marca Fermont.
Glicerol al 99.7% grado reactivo marca Fermont.
Extracto de hojas de <i>Melicoccus Bijugatus</i> sin tallo.
Extracto de fruto de <i>Melicoccus Bijugatus</i> .

A las películas control y películas de quitosano-almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* se les realizó pruebas de contaminación previa y pruebas antimicrobianas, los reactivos usados en este ensayo fueron los siguientes:

Reactivo
Agar para método estándar marca Bioxon.
Agar dextrosa – papa para hongos marca Bioxon.
Agar bilis rojo violeta para coliformes totales.
Ácido tartárico marca Mallinckrodt Chemical pureza 100% activo analítico.
Colonias de hongo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (blanco), <i>Penicillium digitatum</i> (verde) y <i>Aspergillus Niger</i> (negro).
Agua destilada marca Fermont.
Agua de ciruela de la refresquería La Michoacana.
Muestra de queso marca La Hacienda.
Material de manejo para pruebas microbiológicas (cajas Petri, asas bacteriológicas, pipetas y tubos de dilución)

Para la caracterización del equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* se usó el siguiente reactivo:

Reactivos
Cloroformo deuterado 99.8 % atom conteniendo 1 % (v/v) TMS como referencia marca Sigma-Aldrich.

2.3. Obtención del extracto por el método Soxhlet

La muestra sólida del *Melicoccus Bijugatus* se pulverizó colocándose en un cartucho de algodón puro de celulosa, el cuál es un material poroso, situándolo en la cámara del extractor Soxhlet (ver

Figura 2.1). Se calentó el disolvente extractante situado en el matraz, condensando sus vapores, los cuales caen gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanzó la parte superior del sifón lateral, el disolvente con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso fue repetido hasta completar la extracción de analitos de la muestra y se concentró el extracto de componentes fenólicos del *Melicoccus Bijugatus* en el disolvente.



Figura 2.1 Dispositivo de extracción Soxhlet.

El extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* fue filtrado y agregado a las películas a temperatura ambiente, siendo compatible con la matriz de la película.

2.4. Síntesis de películas control de quitosano-almidón y películas de quitosano – almidón con extracto de hoja y extractor de fruto de *Melicoccus Bijugatus*.

Las películas control de quitosano – almidón con ácido acético y quitosano – almidón con ácido fórmico se sintetizaron por dispersión. La solución de quitosano-almidón con ácido acético (1 %, v/v) agitándose constantemente durante 24 horas. La solución de quitosano-almidón (2 %, p/v) con ácido fórmico se preparó utilizando las mismas concentraciones.

La solución de almidón (2%, p/v) se preparó mediante calentamiento a $90 \pm 2^\circ \text{C}$ (temperatura de gelatinización) durante 20 min, agitando constantemente. Posteriormente, la solución se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente, bajo agitación constante [59][60].

Las películas de quitosano - almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* se sintetizaron mezclando 40 mL de la solución de quitosano (2 %, p/v) con 40 mL de la solución de almidón (2%, p/v) adicionando glicerol al 0.25% (v/v) del total de la mezcla, se incorporó el extracto de hoja ó el extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*, según sea el caso, en una cantidad al 0.5, 5 y 10%, v/v (del peso total de la mezcla). Cada mezcla fue vertida en una bandeja de poliestireno bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, así como protegido de la luz natural y artificial. Aproximadamente 15 días después se formaron las películas.

En la Tabla 2.1 se indica la nomenclatura usada para las películas control de quitosano – almidón y las películas de quitosano – almidón con extracto de hoja y extracto de fruto.

Tabla 2.1. Nomenclatura de las películas.

Numero de película	Nomenclatura	Numero de película	Nomenclatura
1	QAa	8	QAf
2	QAaF0.5	9	QAfF0.5
3	QAaF5	10	QAfF5
4	QAaF10	11	QAfF10
5	QAaH0.5	12	QAfH0.5
6	QAaH5	13	QAfH5
7	QAaH10	14	QAfH10

Los números indican el porcentaje de extracto añadido del peso total de la matriz. Donde QAa= quitosano – almidón con ácido acético, QAf= quitosano – almidón con ácido fórmico, QAaF= Películas con ácido acético y fruto a diferentes concentraciones, QAaH= Películas con ácido acético y hojas a diferentes concentraciones, QAfF= Películas con ácido fórmico y fruto a diferentes concentraciones, QAfH= Películas con ácido fórmico y hoja a diferentes concentraciones.

2.5. Pruebas antimicrobianas

Una vez obtenidas las películas de quitosano – almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*, se analizó el efecto antimicrobiano de cada polímero elaborado, a los cuales se les aplicó el método de cultivo de vertido en placa, usando agar dextrosa – papa, agar bilis rojo – violeta, y agar para método estándar. Previamente, se esterilizó mediante vía seca el material de manejo en una estufa durante 2 horas a 150 °C.

2.5.1. Aislamiento de cepas

Se usó la técnica de agotamiento de asa: se agitó el frasco de cultivo y por medio de un asa fría que se flameó previamente, se rozó la superficie del medio de cultivo sembrando por estrías de forma consecutiva sin recargar el asa, para obtener las colonias. Este proceso se realizó cuando menos en 2 placas.

Los medios utilizados fueron Agar de Métodos Estándar, Agar Bilis Rojo Violeta y Agar Dextrosa-Papa, incubando a la temperatura indicada por cada norma.

2.5.2. Pruebas de contaminación previa

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

2.5.3. Prueba contra mesofílicos aerobios

Para el cultivo de mesofílicos aerobios se utilizó Agar para método estándar. Por cada 1000 ml de agua destilada se utilizaron 23.5 g de agar, la solución se calentó a 100 °C y se dejó en ebullición por 1 minuto, bajo agitación constante. El agar se esterilizó en un autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos. Para el cultivo de estos microorganismos se utilizó como muestra de agua de

ciruela, se colocó en un tubo de ensayo con 10 mL de agua esterilizada 1 mL de agua de ciruela, se agitó y a partir de la disolución de 10 ml con la muestra de agua de ciruela se tomó 0.1 ml para inocular cada caja Petri, se vertió el medio de cultivo respectivo hasta cubrir el fondo de la caja. Se movió la caja 7 veces hacia la derecha, la izquierda, arriba, abajo para mezclar la muestra y el agar, y se esperó a que el medio se solidificará colocándose las muestras circulares de películas, las cajas se depositaron posteriormente en la incubadora a 37 °C, observándose después de 24 horas [61].

2.5.4. Prueba contra coliformes totales

Se usó agar bilis rojo-violeta. Por cada 1000 ml de agua destilada se utilizaron 41.5 g de agar, la solución se calentó a 100 °C y se dejó en ebullición por 1 minuto, bajo agitación constante. El agar y los tubos de dilución (con 10 ml de agua destilada) se esterilizaron en un autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Para el cultivo de coliformes se agregó 1 gr de queso aproximadamente en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada y esterilizada, se agitó. Se tomó 0.1 mL inoculando cada caja Petri, vertiendo el medio de cultivo, se movió la caja 7 veces hacia la derecha, la izquierda, arriba, abajo para mezclar la muestra y el agar, colocándose posteriormente los círculos de las películas sobre el agar, colocándose posteriormente las cajas Petri en la incubadora a 37 °C, observándose después de 24 y 48 horas [62].

2.5.5. Prueba contra hongos

Para el cultivo de hongos se usó agar dextrosa-papa. Por cada 1000 ml de agua destilada se utilizaron 39 g de agar, se sometió a calentamiento hasta 100 °C y se dejó ebullición por 1 minuto agitando constantemente.

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

En el caso de la muestra de hongos, se raspó con un asa bacteriológica tomando una muestra de la colonia a estudiar y se colocó en el tubo de ensayo para hacer una dilución en 10 mL de agua destilada y esterilizada.

De esta disolución se empleó 0.1 mililitro, agregándolo a cada caja Petri en cada una de las pruebas microbiológicas. Se añadió el agar respectivo hasta cubrir el fondo de la caja. Se movió la caja 7 veces hacia la derecha, la izquierda, arriba, abajo para mezclar la muestra y el agar colocando los círculos de muestra de película una vez que el agar ha solidificado. Los hongos se estudiaron a 25 °C durante 5 días = 120 horas [63].

Las pruebas antimicrobianas se basaron en el método de discos Bauer & Kirby determinadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se colocó un círculo de cada muestra en la caja Petri con medio de cultivo y muestra, cada caja Petri fue observada en una luz indirecta y cada halo de inhibición fue medido utilizando una regla graduada [64].

Posteriormente, se caracterizaron las películas mediante diversas técnicas para conocer el efecto del solvente y el extracto sobre las propiedades físicas, químicas, ópticas, morfológicas, mecánicas y térmicas de éstas.

2.6. Métodos de caracterización

El análisis de las propiedades y características de las películas quitosano – almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* se llevó a cabo mediante el uso de los métodos de caracterización tales como: medición de espesor, potencial de hidrógeno, Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (EITF), Espectroscopía Ultravioleta – Visible (UV - Vis), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Análisis Termogravimétrico (ATG), Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CGEM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

2.6.1. Medición de espesor.

En la Figura 2.2 se observan los puntos de la medición del espesor de la película con un micrómetro manual modelo 264105 marca OBI con un rango de medición de 0 – 25 mm. En cada

muestra se midió el espesor en 5 diferentes puntos: central, superior, inferior y extremos laterales, el valor promedio de estos cinco puntos se consideró como el espesor de las películas [65][66].

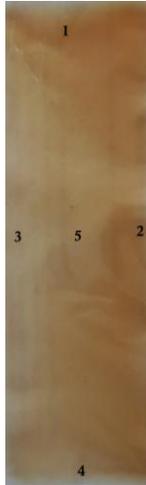


Figura 2.2 Puntos de medición de espesor.

2.6.2. Medición de potencial de hidrógeno (pH)

Para observar la relación del pH con las propiedades antimicrobianas se utilizó el potenciómetro modelo 2 Star pH Bench Top marca Thermo Scientific. Para comprobar las mediciones, se utilizaron tiras reactivas de pH marca MColorpHast™.

Para determinar el pH de las películas cuando ya están secas (día 15) se cortó la película adicionando 5 mL de agua destilada recientemente hervida a temperatura ambiente, hasta obtener una pasta uniforme, sumergiendo el electrodo en la muestra [67].

2.6.3. Determinación de color mediante software.

La evaluación de la coloración de las películas se realizó visualmente el día 15 a fin de comprender los factores involucrados en los cambios de coloración. La coloración se evaluó mediante el software analizador Image Color Summarizer [68]. Se obtuvieron valores RGB de cada película utilizando fotos tomadas el día 15, durante la adquisición de imágenes, cada película se colocó sobre un fondo blanco; la distancia entre la película y la cámara era aproximadamente 20 cm. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara de 13 megapíxeles con una resolución de 12,780, 288 con autofocus utilizando luz natural. Todas las imágenes

fueron guardadas y procesadas posteriormente usando una computadora personal y el software analizador de imágenes.

2.6.4. Propiedades ópticas (transparencia y opacidad)

Se cortó una muestra en forma rectangular de 7 x 40 mm aproximadamente, se introdujó en la celda de cuarzo del espectrofotómetro UV-Vis marca GBC modelo Cintra 303 (Figura 2.3). Se utilizó la celda con aire como referencia. Los espectros de cada película se obtuvieron en un rango de longitud de onda de 200 – 800 nm, se consideraron los valores de 280 nm que es la absorción de luz UV y a 400 nm la absorción de luz visible, debido a que es la longitud de onda donde la luz UV tiene su máxima absorción. Los resultados se obtuvieron en porcentaje de transmitancia (%T). Las pruebas se realizaron por triplicado para cada muestra considerando el valor promedio para los resultados [69].

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

$$T_{600} = \frac{-\log \%T}{b}$$

Dónde:

%T = Porcentaje de transmitancia.

b= Espesor de la película, mm.

Los valores de opacidad (O) se obtuvieron utilizando el valor promedio de la absorbancia a 500 nm y el espesor promedio en la siguiente ecuación [66][70]:

$$O = A_{500} \times b$$

Dónde:

A_{500} = Absorbancia a 500 nm

b= Espesor de la película, mm.

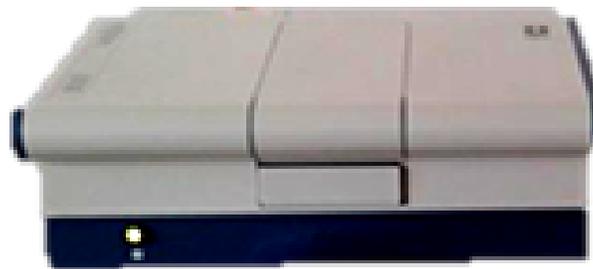


Figura 2.3 Espectrofotómetro UV-Vis marca GBC modelo Cintra 303.

2.6.5. Determinación de capacidad antioxidante de las películas.

Para determinar la capacidad antioxidante presente en las películas se utilizó un equipo de espectroscopía UV-vis. Para llevar a cabo un análisis cuantitativo UV – vis se prepararon extractos de todas las películas, utilizando etanol y el método descrito a continuación: se pesaron 0.25 g de cada muestra y se agregaron 4 ml de etanol. Se dejaron en baño de agitación mecánica modelo 12050-00 Ciculator marca Polystat a 25 °C y 90 rpm durante 10 minutos. Después de esto, cada extracto se colocó en una centrífuga modelo Microlite-RF marca Thermo 19 °C y 13000 rpm durante 10 minutos. Los extractos obtenidos se almacenaron en viales de vidrio ámbar y se protegieron contra la luz utilizando papel aluminio [71].

La capacidad antioxidante se determinó (en la región visible del espectro) usando el método de Folin - Denis. Los análisis se hicieron por triplicado: a 0.3 ml de extracto se le agregaron 1.5 ml de reactivo Folin – Denis (diluido 10 veces en agua) y 1.2 ml de carbonato de sodio al 7.5 % (p/v). Las muestras fueron agitadas, cubiertas con su tapa y se dejaron en reposo durante 30 minutos. Posteriormente, se midió la absorción a 765 nm. La capacidad antioxidante fue expresada en equivalentes mg de ácido gálico [72][74], realizando el trazado de una curva de calibración, construida a partir de la solución stock de ácido gálico de 0.2 mg/mL, tomando alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas (0, 40, 80, 120, 160 y 200 ppm). El valor de medición de absorbancia a 765 nm también es reportado por Pourmorad en 2006 [75], y por McDonald en 2001 [76]. Obteniendo un valor de regresión mayor a 0.99 [77]- [78].

2.6.6. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para estudiar la morfología de las películas se utilizó un equipo MEB modelo JSM 7100F marca JEOL usando magnificaciones de 500x, 750x y 1500x y 1700x para la película control (QAa) y 300x, 700x y 1700x para el resto de las muestras. Las imágenes se obtuvieron a partir de electrones secundarios, con un voltaje de aceleración de 2 y 5 kV a alto vacío. Se utilizó una cinta conductora de carbón para sujetar la muestra.

2.6.7. Análisis Termogravimétrico (ATG)

Para observar la estabilidad térmica de las películas se usó un equipo de análisis termogravimétrico modelo SDT Q600 V20.9 Build 20 marca TA Instruments. Las condiciones que se usaron son: atmósfera de aire a 50 ml/min, intervalo de estudio de 10 ° a 600 °C y rampa de calentamiento a 10 °C/min. El tamaño de la muestra a usarse fue de 18 mg aproximadamente.

2.6.8. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF)

Para la determinación de los grupos funcionales presentes en las películas se utilizó el equipo de EITF modelo Spectrum one marca Perkin Elmer. El método utilizado fue el de Reflectancia Total Atenuada (RTA), con celda de diamante, con 12 barridos y una resolución de 4 cm⁻¹ en un rango de 4000 a 600 cm⁻¹.

2.6.9. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para obtener un estudio más detallado de la estructura de las moléculas se realizaron los análisis del espectro ¹H RMN para el extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* se llevaron a cabo a 25 °C utilizando un spinner de plástico en el equipo RMN Bruker AVANCE III HD de 400 MHz. Se colocaron 15 mg de muestra disuelta en 0.55 mL de cloroformo deuterado (CCl₃D) como disolvente, en un tubo de vidrio de 5 mm de diámetro y 7 pulgadas de longitud.

2.6.10. Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CGEM)

Esta técnica combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y

cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad, está indicada para la separación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles.

Para realizar este análisis se usaron aproximadamente 100 µl de extracto. El equipo empleado fue cromatógrafo de gases – espectrometría de masas Clarus 600S PerkinElmer con las siguientes especificaciones:

Automuestreador:

Temperatura del horno: 200 °C; Tiempo de calentamiento: 0.2 min; Tiempo de presurización: 0.5 min; Presión de gas: 22 psi; Tiempo de inyección: 1 min.

Cromatógrafo de gases:

Columna: Elite-624 Fase estacionaria con entrecruzamiento de 6% cianopropilfenil-94% dimetil polisiloxano; Horno: 40 °C/ min --> 8 °C/min --> 220 °C/1 min; Puerto de inyección: 220 °C.

Flujo de He: 0.8 mL/min; Fractura: 10:1.

Espectrómetro de masas:

Relación m/z: 30-400; Línea de transferencia: 220 °C; Fuente: 220 °C; Ionización: Impacto electrónico a 70 eV.

2.6.11. Análisis estadístico:

Los valores de la desviación estándar de la Tabla 3.2 a la Tabla 3.10 y 3.12, se obtuvieron mediante el uso del programa Excel de Microsoft Office versión 2007.

Capítulo 3.- Resultados y Discusión.

3.1. Características de las películas de quitosano-almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*.

En la Figura 3.1 se muestra la coloración de las películas. La película control elaborada con ácido acético mostró una coloración ligeramente amarillenta, flexible y translúcida. La película elaborada con ácido fórmico mostró una coloración amarillenta más intensa que la película elaborada con ácido acético, también es translúcida, flexible.

Las películas de quitosano – almidón con extractos presentaron diversas coloraciones y distintos niveles de transparencia. Las películas de quitosano – almidón elaboradas con ácido acético y extracto de hoja de *Melicoccus Bijugatus* son translúcidas, flexibles y con una coloración verde claro QAaH0.5, QAaH5 y QAaH10, conforme va aumentando la concentración se vuelven rígidas y opacas. Las películas de quitosano – almidón con ácido fórmico y extracto de hoja QAfH0.5, QAfH5 y QAfH10 son más rígidas que las elaboradas con ácido acético, presentando una coloración más oscura conforme fue aumentando la concentración del extracto, la coloración es atribuida a la clorofila.

Las películas de quitosano – almidón elaboradas con ácido acético y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* son translúcidas, flexibles y con una coloración amarillenta - anaranjada QAaF0.5, QAaF5 y QAaF10, conforme va aumentando la concentración se tornaron rígidas y opacas. Las películas de quitosano – almidón con ácido fórmico y extracto de fruto QAfF0.5, QAfF5 y QAfF10 son más rígidas que las elaboradas con ácido acético, presentando una coloración más oscura conforme fue aumentando la concentración del extracto, la coloración es atribuida a la composición fenólica en especial a la Naringenina que se encuentra también en las toronjas.

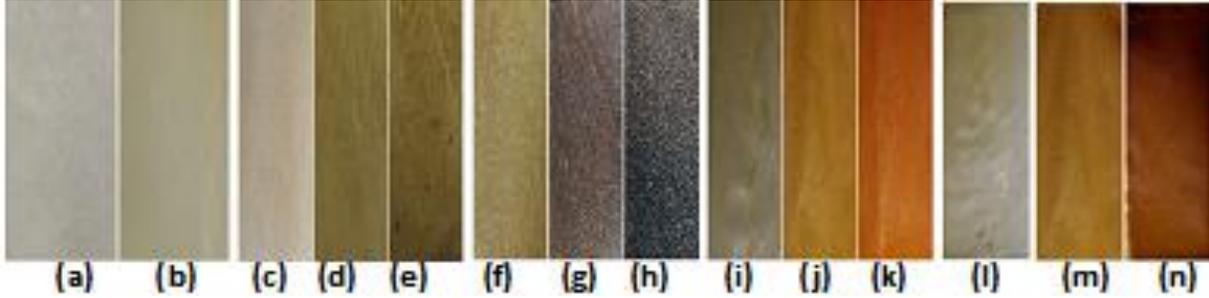


Figura 3.1 Coloración de películas (a) QAa, (b) QAf, (c) QAaH0.5, (d) QAaH5, (e) QAaH10, (f) QAfH0.5, (g) QAfH5, (h) QAfH10, (i) QAaF0.5, (j) QAaF5, (k) QAaF10, (l) QAfF0.5, (m) QAfF5 y (n) QAfF10.

Los datos obtenidos mediante el software Image Color Summarizer se indican en la Tabla 3.1

Tabla 3.1 Evaluación de coloración de películas

Nomenclatura	Coloración	Valor promedio RGB		
		Rojo	Verde	Azul
QAa	Amarillo claro	146 ± 50.9	136 ± 52.0	106 ± 18.5
QAaH0.5	Verde claro	133 ± 82.7	116 ± 86.8	70 ± 97.7
QAaH5	Verde medio	130 ± 73.2	110 ± 8	33 ± 75.8
QAaH10	Verde oscuro	117 ± 98.0	90 ± 102.3	18 ± 119.5
QAaF0.5	Naranja claro	133 ± 90.1	117 ± 92.6	68 ± 98.8
QAaF5	Naranja medio	160 ± 66.5	67 ± 115.9	1 ± 133.4
QAaF10	Naranja oscuro	116 ± 63.7	22 ± 88.8	22 ± 93.7
QAf	Amarillo	147 ± 42.6	133 ± 44.1	85 ± 41.5
QAfH0.5	Verde claro	147 ± 78.0	118 ± 79.7	28 ± 101.2
QAfH5	Verde medio	136 ± 61.4	107 ± 63.9	23 ± 65.2
QAfH10	Verde oscuro	21 ± 130.3	13 ± 140.4	13 ± 138.7
QAfF0.5	Naranja claro	161 ± 59.1	107 ± 64.5	14 ± 40.7
QAfF5	Naranja medio	92 ± 74.2	45 ± 99.4	16 ± 108.8
QAfF10	Naranja oscuro	63 ± 32.4	9 ± 40.5	8 ± 37.1

3.2. Pruebas antimicrobianas

Después de la síntesis de las películas control de quitosano – almidón y películas de quitosano – almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* en los diferentes porcentajes, se analizó la actividad antimicrobiana de cada película, las cuales se realizaron aplicando el método de cultivo de vertido en placa, usando agar para método estándar (para mesofílicos Aerobios), agar bilis rojo violeta (para coliformes totales) y agar dextrosa-papa (para hongos).

En la Figura 3.2 se muestran los medios de cultivo de a) agar para método estándar, b) agar bilis rojo violeta, c) agar dextrosa – papa y d) placas con medio de cultivo.

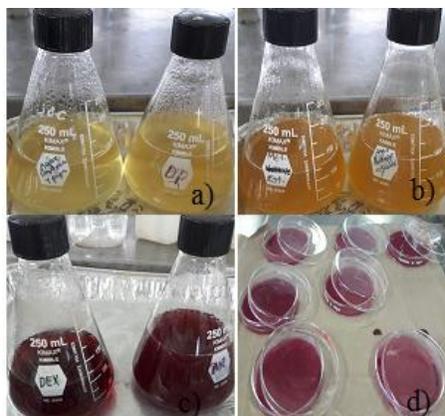


Figura 3.2 Medios de cultivo de a) agar para método estándar, b) agar dextrosa – papa, c) agar bilis rojo violeta y d) placas con medio de cultivo.

3.2.1. Pruebas de contaminación previa

Las pruebas de contaminación previa se realizaron para determinar que películas se encontraban contaminadas antes de iniciar con los análisis de inhibición microbiana.

Al realizar la prueba se observó que las películas están por debajo del valor marcado por la norma que es del intervalo de 25 a 250 UFC para Mesofílicos aerobios [79], todas las películas con extracto con respecto a la película control mostraron un valor más bajo de UFC con excepción de la película **QAFH10** por lo que se realizó la pasteurización de las películas para realizar las pruebas antimicrobianas.

En la Figura 3.3 se muestran las placas con agar método estándar (para bacterias Mesofílicas aerobias).



Figura 3.3 Prueba de contaminación previa con agar para método estándar.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de contaminación previa.

Tabla 3.2 Resultados de pruebas de contaminación previa.

Nomenclatura	Pruebas aprobadas	UFC	Nomenclatura	Pruebas aprobadas	UFC
QAa	3/3	6 ± 0	QAf	0/3	0 ± 0
	3/3	6 ± 0		3/3	8 ± 0
QAaH0.5	1/3	1 ± 0.6	QAfH0.5	3/3	7 ± 0
	0/3	0 ± 0		1/3	1 ± 0.6
QAaH5	3/3	3 ± 0	QAfH5	3/3	4 ± 0
	3/3	3 ± 0		3/3	3 ± 0
QAaH10	3/3	5 ± 0	QAfH10	3/3	11 ± 0
	0/3	0 ± 0		3/3	2 ± 0
QAaF0.5	3/3	3 ± 0	QAfF0.5	3/3	2 ± 0
	3/3	3 ± 0		3/3	2 ± 0
QAaF5	3/3	2 ± 0	QAfF5	3/3	9 ± 0
	3/3	3 ± 0		3/3	6 ± 0
QAaF10	3/3	3 ± 0	QAfF10	3/3	3 ± 0
	3/3	4 ± 0		3/3	6 ± 0

UFC= Unidades formadoras de colonias

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

En la Figura 3.4 se muestran las cajas Petri con cepas de Mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos.

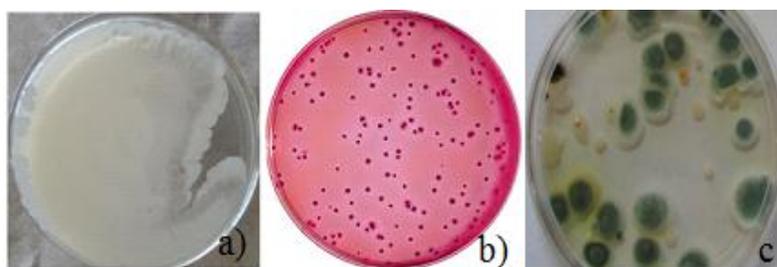


Figura 3.4 Medios de cultivo con cepas a) Mesofílicos aerobios, b) coliformes totales, c) hongos.

3.2.2.1. Cultivo de mesofílicos aerobios

En la Figura 3.5 se observan las cajas Petri con las películas **QAaH5**, **QAaF10**, **QAFH5** y **QAFH10**, las cuales mostraron mayor efecto antimicrobiano contra mesofílicos aerobios dando como resultado mayores zonas de inhibición, cuyas medidas se muestran en la Tabla 3.4

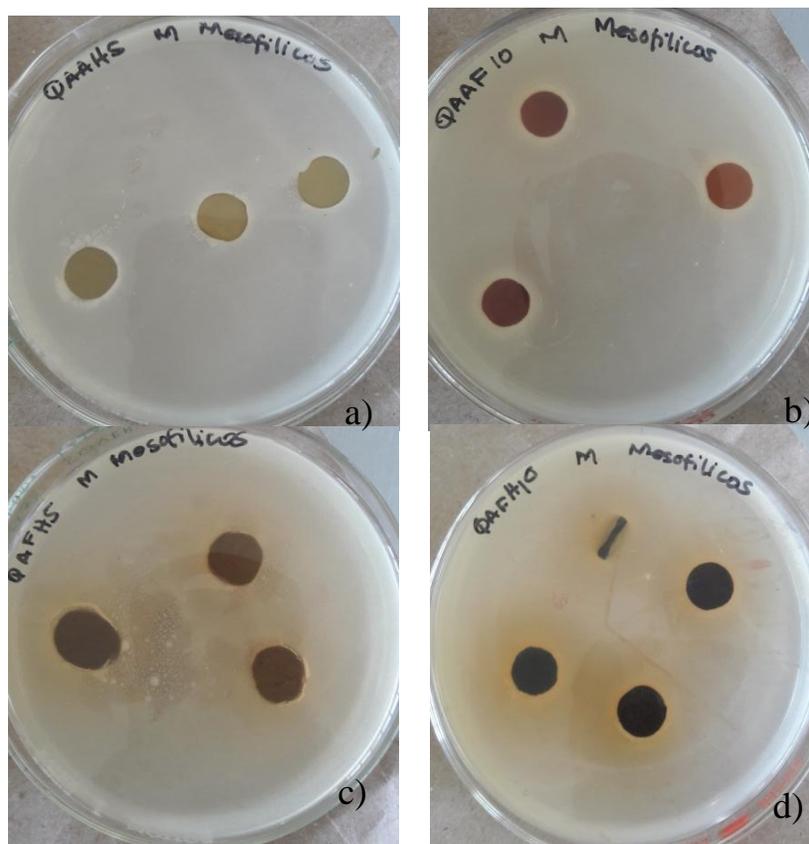


Figura 3.5 Prueba antimicrobiana contra mesofílicos aerobios de las películas a) QAaH5, b) QAaF10, c) QAFH5 y d) QAFH10.

La mejora de la actividad antimicrobiana en Mesofílicos aerobios, se le puede adjudicar a la concentración del extracto, al extracto de hoja y al solvente. Debido a que se investigó con extracto de antioxidantes a concentraciones de 0.5, 2 y 5 % [1], al mayor contenido fenólico en las hojas que en el fruto del *Melicoccus Bijugatus* [58], la actividad antibacteriana de las soluciones ácidas de quitosano [80].

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de las pruebas antimicrobianas de mesofílicos aerobios.

Tabla 3.3 Resultados de pruebas antimicrobianas de mesofílicos aerobios.

Nomenclatura	Pruebas aprobadas	Halo de inhibición promedio	Nomenclatura	Pruebas aprobadas	Halo de inhibición promedio
QAa	0/3	0 ± 0	QAf	0/3	0 ± 0
QAaH0.5	0/3	0 ± 0	QAfH0.5	0/3	0 ± 0
QAaH5	3/3	0.3 ± 0.3	QAfH5	3/3	0.8 ± 0.6
QAaH10	0/3	0 ± 0	QAfH10	3/3	0.2 ± 0
QAaF0.5	0/3	0 ± 0	QAfF0.5	0/3	0 ± 0
QAaF5	0/3	0 ± 0	QAfF5	0/3	0 ± 0
QAaF10	3/3	0.2 ± 0.1	QAfF10	0/3	0 ± 0

3.2.2.2. Cultivo de organismos coliformes

Se seleccionaron las placas que contenían entre 15 y 250 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm. Las películas en las cuales se observaron halos de inhibición mayores a 0.5 mm fueron **QAaH0.5, QAaH5, QAaH10, QAaF5, QAaF10, QAfH0.5, QAfH5, QAfH10, QAff0.5, QAff5 y QAff10** determinando que estas son las películas que funcionaron mejor.

En la Figura 3.6 se muestran las películas que mostraron mayor efecto antimicrobiano contra coliformes totales las cuales fueron **QAaH0.5, QAaH5, QAaH10, QAaF5, QAaF10, QAfH0.5, QAfH5, QAfH10, QAff0.5, QAff5 y QAff10** que mostraron mayor efecto antimicrobiano contra Coliformes totales dando como resultado zonas de inhibición de los cuales se muestran las medidas en la Tabla 3.5

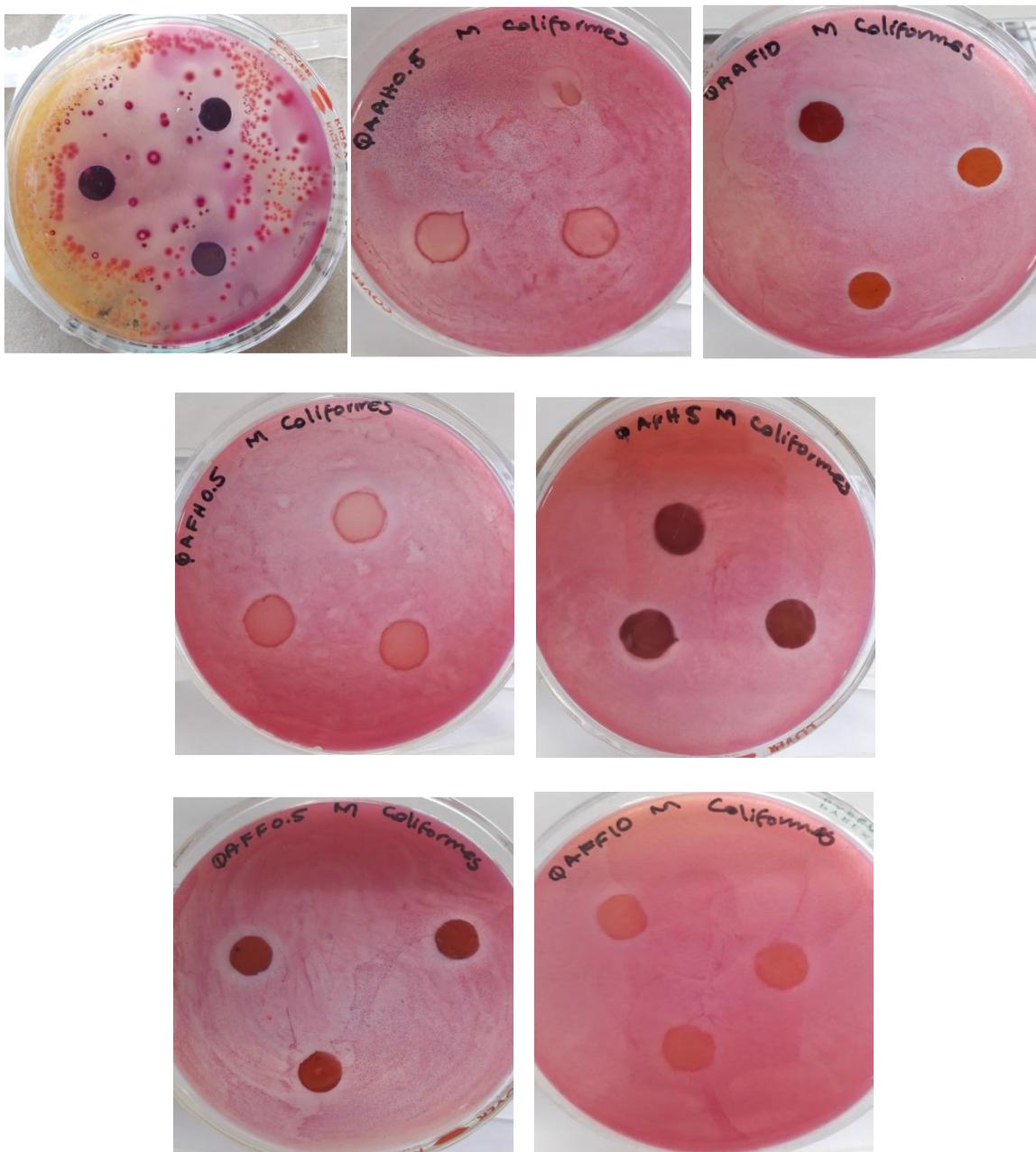


Figura 3.6 Prueba antimicrobiana de coliformes totales.

La actividad antimicrobiana mejorada en coliformes totales, se le puede adjudicar a la concentración del extracto, al extracto de hoja y al tipo de solvente. Debido a que se han realizado investigaciones con extracto de antioxidantes a concentraciones de 0.5, 2 y 5 % [1], al mayor contenido fenólico en las hojas que en el fruto del *Melicoccus Bijugatus* [58], la actividad antibacteriana de las soluciones ácidas de quitosano [80].

En la Tabla 3.4 se muestran los resultados de pruebas antimicrobianas de coliformes totales.

Tabla 3.4 Resultados de pruebas antimicrobianas de coliformes totales.

Nomenclatura	Pruebas aprobadas	Halo de inhibición promedio	Nomenclatura	Pruebas aprobadas	Halo de inhibición promedio
QAa	0/3	-	QAf	0/3	-
QAaH0.5	1/3	0.1 ± 0.2	QAfH0.5	3/3	0.3 ± 0.1
QAaH5	1/3	0.1 ± 0.1	QAfH5	3/3	0.2 ± 0.1
QAaH10	1/3	0.1 ± 0.1	QAfH10	2/3	0.1 ± 0.1
QAaF0.5	3/3	0.1 ± 0	QAfF0.5	3/3	0.3 ± 0.1
QAaF5	3/3	0.2 ± 0	QAfF5	3/3	0.2 ± 0
QAaF10	3/3	0.2 ± 0.2	QAfF10	3/3	0.2 ± 0

3.2.2.3. Cultivo de hongos.

En la Figura 3.7 se muestran las películas que mostraron mayor efecto antimicrobiano contra hongos las cuales fueron **QAaH10**, **QAfH5**, **QAfH10**, **QAfF0.5** y **QAfF5** dando como resultado zonas de inhibición de los cuales se muestran las medidas en la Tabla 3.6.



Figura 3.7 Prueba antimicrobiana de hongos.

En la Tabla 3.5 se observa la actividad antimicrobiana mejorada en hongos se le puede adjudicar a la concentración del extracto, al extracto de hoja y al tipo de solvente. Debido a que se han realizado investigaciones con extracto de antioxidantes a concentraciones de 0.5, 2 y 5 % [1], al mayor contenido fenólico en las hojas que en el fruto del *Melicoccus Bijugatus* [58], entre menor acidez del ácido orgánico usado, mayor interacción con el polímero [81].

Tabla 3.5 Resultados de pruebas antimicrobianas de hongos (*Aspergillus fumigatus*).

Nomenclatura	Pruebas aprobadas	Halo de inhibición promedio	Nomenclatura	Pruebas aprobadas	Halo de inhibición promedio
QAa	0/3	-	QAf	0/3	-
QAaH0.5	0/3	-	QAfH0.5	0/3	-
QAaH5	0/3	-	QAfH5	3/3	0.1 ± 0
QAaH10	3/3	0.1 ± 0	QAfH10	3/3	0.3 ± 0
QAaF0.5	0/3	-	QAfF0.5	2/3	0.1 ± 0.1
QAaF5	0/3	-	QAfF5	3/3	0.1 ± 0
QAaF10	0/3	-	QAfF10	3/3	-

Las películas en las cuales se observaron halos mayores a 0.5 mm fueron **QAaH10, QAfH5, QAfH10, QAfF0.5 y QAfF5** dando buenos resultados con el hongo *Aspergillus fumigatus* las películas elaboradas con ácido fórmico.

3.3. Medición de Espesor.

En la Tabla 3.6 se muestra el espesor de las películas elaboradas con ácido acético con extracto de hoja y extracto de fruto y películas elaboradas con ácido fórmico con extracto de hoja y extracto de fruto, en las películas elaboradas con ácido acético – extracto de hoja se observa que conforme se aumenta la concentración del extracto, aumenta también el espesor de la película. Esto debido a las propiedades filmogénicas del quitosano que se deben a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de sus cadenas. A las propiedades del almidón de arroz como porcentaje de absorción de agua, poder de hinchamiento, capacidad de rehidratación y los enlaces de hidrógeno que se disocian debido a la protonación de los grupos amino y se produce un rápido hinchamiento de la película. En las películas elaboradas con ácido acético – extracto de fruto al 0.5%, se observa que el espesor se conservó con respecto a la película control; en las películas con concentraciones las películas con concentraciones bajas y medias **QAaF5, QAfH0.5, QAfF5 y QAfF5** disminuyó el espesor, este comportamiento se había observado en otras investigaciones y se atribuye a que los polifenoles y el quitosano tienen cargas opuestas y por tanto su mezcla puede originar interacciones que den lugar a una compactación de las cadenas poliméricas y por tanto menor espesor [82].

Tabla 3.6 Espesor promedio de las películas.

Nomenclatura	Espesor promedio, mm	Nomenclatura	Espesor promedio, mm
QAa	0.14 ± 0.01	QAf	0.18 ± 0.02
QAaH0.5	0.16 ± 0.02	QAfH0.5	0.18 ± 0.01
QAaH5	0.21 ± 0.01	QAfH5	0.21 ± 0.01
QAaH10	0.23 ± 0.04	QAfH10	0.23 ± 0.01
QAaF0.5	0.15 ± 0	QAfF0.5	0.11 ± 0.04
QAaF5	0.13 ± 0.02	QAfF5	0.14 ± 0.02
QAaF10	0.22 ± 0.05	QAfF10	0.22 ± 0.03

Precisión del micrómetro = 0.01 mm.

3.4. Medición de potencial de Hidrógeno (pH)

En la Tabla 3.7 se observó que el extracto de hoja presenta un pH más bajo que el extracto de fruto. Los valores más bajos de pH a concentración media de extracto (5 %), disminuyendo en las películas de **QAaF5** y **QAfF0.5**, corroborándose que estas películas presentan un pH más ácido al agregarse los extractos y tienen un mayor efecto antimicrobiano debido al contenido de polifenoles [58].

Tabla 3.7 Valores de pH con potenciómetro y con tira reactiva del extracto de hoja, extracto de fruto y películas de quitosano-almidón con extracto de hoja y extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* al día 15.

Nomenclatura	pH potenciómetro	pH tira reactiva	Nomenclatura	pH	pH tira reactiva
Extracto de hoja	4.26 ± 0.06	4 ± 0	Extracto de fruto	5.91 ± 0.09	6 ± 0
QAa	5.40 ± 0.02	5 ± 0	QAf	4.89 ± 0.03	5 ± 0
QAaH0.5	5.40 ± 0.02	4 ± 0	QAfH0.5	4.66 ± 0.01	5 ± 0
QAaH5	4.87 ± 0	5 ± 0	QAfH5	4.38 ± 0.02	4 ± 1
QAaH10	5.03 ± 0.01	5 ± 0	QAfH10	4.27 ± 0.01	4 ± 1
QAaF0.5	5.00 ± 0	4 ± 1	QAfF0.5	5.23 ± 0.02	4 ± 1
QAaF5	4.78 ± 0	5 ± 0	QAfF5	3.96 ± 0.01	3 ± 0
QAaF10	5.18 ± 0	5 ± 0	QAfF10	4.93 ± 0	4 ± 1

En la tabla 3.8 se observan los valores de pH del extracto de hoja, extracto de fruto y de las películas de quitosano- almidón con extracto de hoja y extracto de fruto, las películas que presentan un pH más bajo son **QAaH5**, **QAaH10**, **QAaF0.5**, **QAaF5**, **QAaF10**, **QAfH0.5**, **QAfH5**, **QAfH10**, **QAfF5** y **QAfF10**. En otras investigaciones se observó que la acidez influye en la actividad antibacteriana [80].

3.5. Propiedades ópticas (transparencia y opacidad)

En la Tabla 3.8 se observó que a 400 nm las películas que dan valores menores de % de transmitancia, son QAaH10, QAaF10, QAaF5 y QAaH0.5, indicativo de mejores propiedades de barrera de luz natural, exceptuando QAaF0.5 y QAaH5 que tienen el valor más alto. Todas las películas presentan valores menores de transparencia en contraposición de QAa. A 400 nm se observó que todas las películas dan valores menores de % de transmitancia. Las películas que presentan valores menores de transparencia son QAfF10, QAfH5 y QAfH0.5, exceptuando QAfH10, QAfF0.5 y QAfF5 en contraposición de QAf. Esto indica que la adición de extractos mejora las propiedades de barrera de luz potencializándose en las películas elaboradas con ácido fórmico, lo que permitiría la mejor conservación de alimentos evitando fenómenos de descomposición. Se observan resultados similares a los obtenidos por Lozano Navarro y colaboradores en 2017 trabajaron con películas de quitosano – almidón con extractos naturales de arándano, betabel, resveratrol, granada, donde se observó la adición de los polifenoles mejorando las propiedades ópticas [1]. Kannat y col. en 2012 trabajaron con películas de quitosano – alcohol polivinílico con extracto de menta y granada, los extractos añadidos mejoraron las propiedades de barrera ya que exhibieron baja transmisión de luz especialmente en longitudes de onda de 280 nm, resultando un efecto potenciador sobre la capacidad antioxidante y los extractos naturales están relacionados con el decremento de la transparencia y el incremento de la opacidad [66]. Se observa que las películas con mayor espesor (QAfH5 y QAfH10) presentan una reducción muy significativa en los valores de transparencia/ % Transmitancia, así como aumento en opacidad y mejor actividad antimicrobiana. La medición se realiza en el rango de 280 nm de uv, ya que en este rango corresponde a la transmisión de luz UV, que es la causante de la descomposición lipídica en los alimentos y 400 nm que es el rango de la luz visible [66].

Tabla 3.8 Valores de % Transmitancia, transparencia y opacidad de las películas.

Nomenclatura	%T a 280 nm	%T a 400 nm	Transparencia	Opacidad
QAa	0.968	2.710	7.805	0.091
QAaH0.5	0.457	2.113	4.940	0.116
QAaH5	7.061	7.082	2.549	0.225
QAaH10	0.005	0.006	7.689	0.298
QAaF0.5	0.135	3.161	8.373	0.072
QAaF5	0.035	0.160	6.916	0.129
QAaF10	0.002	0.139	4.655	0.247
QAf	1.131	3.470	7.027	0.105
QAfH0.5	0.135	1.724	5.144	0.141
QAfH5	0.008	0.004	6.014	0.436
QAfH10	0.001	0.002	9.313	0.831
QAfF0.5	0.058	0.990	10.560	0.127
QAfF5	0.018	0.360	10.346	0.151
QAfF10	0.001	0.006	6.713	0.309

3.6. Determinación de capacidad antioxidante de las películas

En la Figura 3.8 se observa la curva de calibración obtenida para conocer la cantidad de antioxidantes presentes en cada muestra de película, se construyó utilizando distintas concentraciones conocidas de ácido gálico: 0, 80, 120 y 200 ppm. Se elaboró un gráfico de calibración de absorbancia en el eje “Y” y la concentración en el eje “X” para las soluciones estándar.

Los puntos de los datos caen a lo largo de una línea recta. Se trazó una línea de tendencia y se encontró la ecuación de la recta $y = 0.000009x + 0.0175$ con una regresión lineal de 0.9742.

Se substituyó la absorbancia a 765 nm de cada solución en la ecuación determinada como igual a “Y” y se resolvió la ecuación para encontrar “X”, la cual representa la concentración.

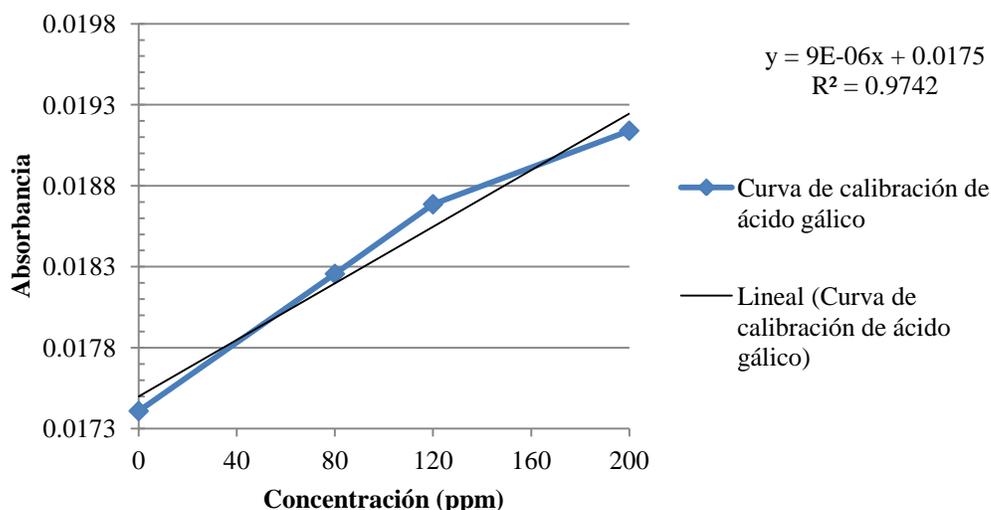


Figura 3.8 Curva de calibración de ácido gálico.

En la Tabla 3.9 se observa que las películas que presentan una mayor capacidad antioxidante son QAfH10 y QAaF0.5. Siendo QAfH10 la película que funciona mejor en las pruebas antimicrobianas, presentando mayor espesor promedio, de los menores valores de pH y reducción muy significativa en los valores de transparencia, % Transmitancia, así como aumento en opacidad. La capacidad antioxidante fue expresada en equivalentes mg de ácido gálico [72] [74], obteniendo un valor de regresión de 0.97 [77][78].

Tabla 3.9 Capacidad antioxidante de cada película (mg/mg equivalente de ácido gálico).

Nomenclatura	Capacidad antioxidante	Nomenclatura	Capacidad antioxidante
QAaH0.5	0.01 ± 0.002	QAaF0.5	0.03 ± 0.019
QAaH5	0.01 ± 0.003	QAaF5	0.02 ± 0.005
QAaH10	0.02 ± 0.001	QAaF10	0.02 ± 0.011
QAfH0.5	0.02 ± 0.002	QAfF0.5	0.02 ± 0.002
QAfH5	0.01 ± 0.002	QAfF5	0.01 ± 0.002
QAfH10	0.03 ± 0.004	QAfF10	0.02 ± 0.004

3.7. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (EITF)

En la Figura 3.9 se muestra el espectro EITF comparativo de QAa, QAf, QAaH10, QAfH10, AaF10 y QAfF10. La banda a 3200 cm⁻¹ aproximadamente es ancha esto debido a la gran cantidad de enlaces de estiramiento -OH indicativo de la presencia de azúcares, agua, ácidos

carboxílicos, etc, [51] en 2940 cm^{-1} las películas con extracto y ácido acético se presenta un estiramiento C-H que indica la presencia de grupos carbonilos asociados a los ácidos [51], comprobándose en el doblete presente en 1380 cm^{-1} aproximadamente, a 1570 cm^{-1} se tiene una vibración de enlace N-H que corresponde al grupo amino, en 1022 cm^{-1} hay un pronunciado estiramiento C-N, en las películas con extracto de hoja se indica la presencia de una banda de tensión O-H a 3270 cm^{-1} , hay una banda de tensión a 1153 cm^{-1} aproximadamente que indica la presencia de fenoles, estando menos pronunciada que en las películas de fruto, a 570 cm^{-1} se observa una vibración de torsión de enlace C-OH. Se realizó la caracterización de EITF estas películas debido a que fueron las que dieron mejor resultado en las pruebas microbiológicas y se quería comprobar si el incremento de extracto contribuía al efecto antimicrobiano.

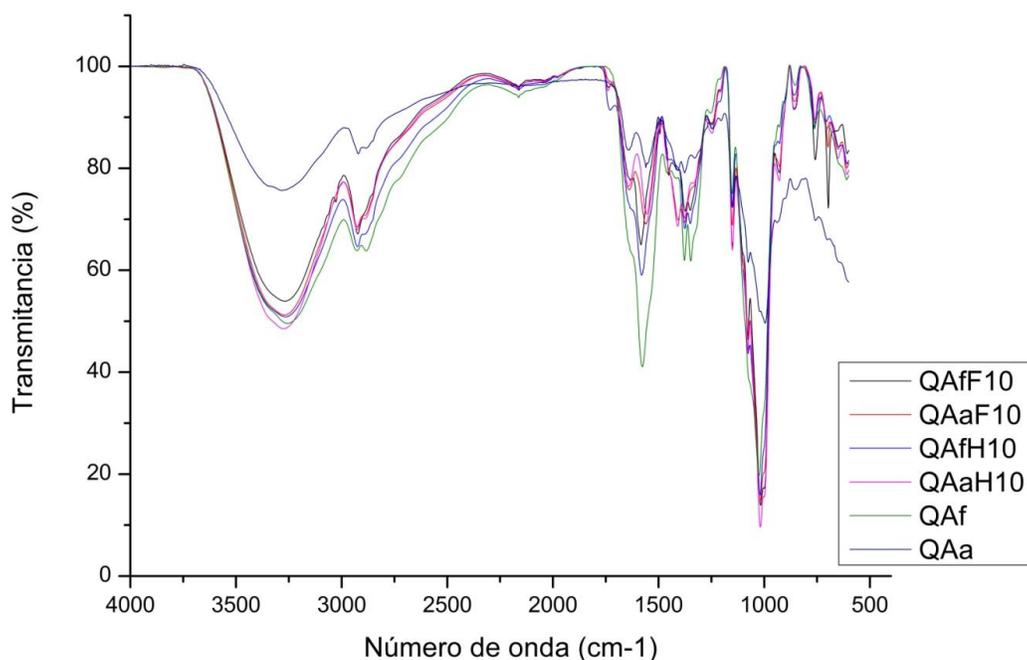
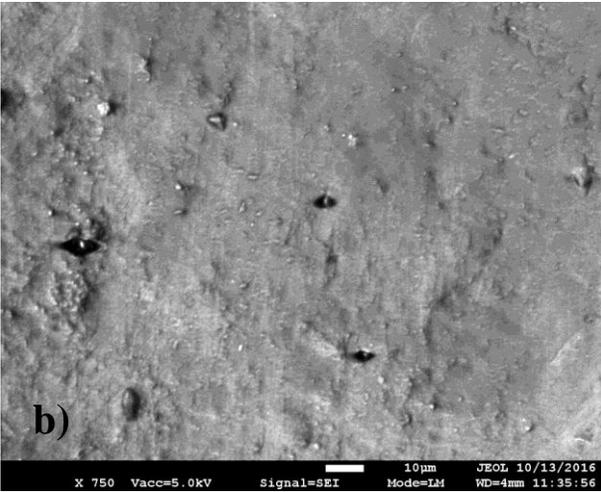
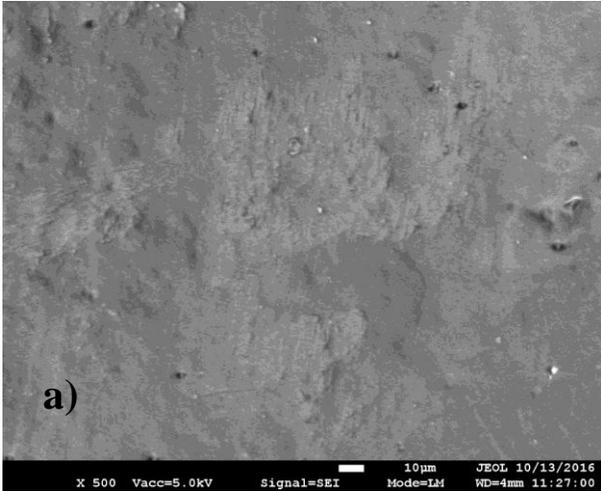


Figura 3.9 Espectro EITF comparativo de QAa, QAf, QAaH10, QAfH10, QAaF10 y QAfF10.

3.8. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En la Figura 3.10 se muestran las imágenes de MEB obtenidas sobre la superficie de la película de quitosano – almidón (QAa). Se muestra una superficie de apariencia más homogénea que las películas con extracto, lo que indica que la película presenta, una buena interacción entre sus componentes. Se observa la presencia de líneas acanaladas y algunos puntos blancos asociados a

la presencia de almidón [83][85]. Esta película presentó nula actividad ante mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos.



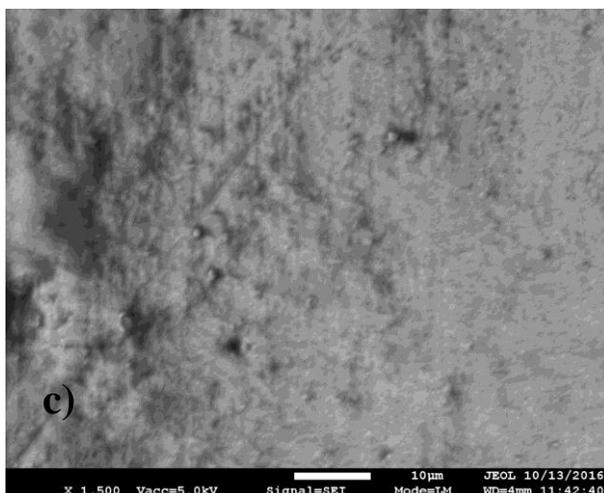
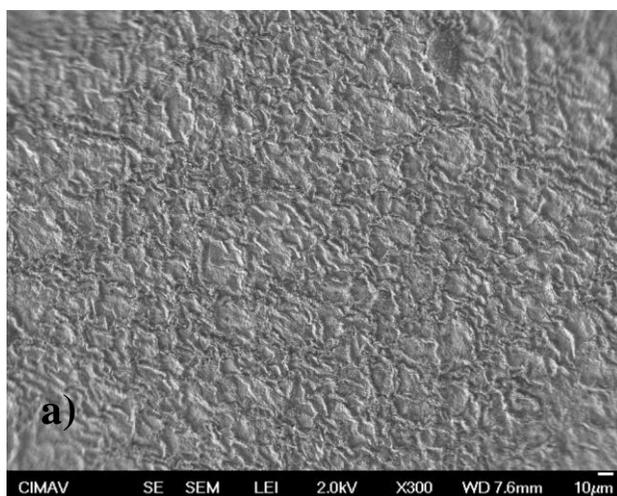


Figura 3.10 Micrografías de la película de quitosano – almidón QAa a diferentes magnificaciones: a) 500x, b) 750x y c) 1500x.

En la Figura 3.11 se muestran las imágenes obtenidas de la película de quitosano – almidón QAf. Muestra que la superficie de la película tiene un aspecto superficial no liso, heterogénea, probablemente debido a un rasgo otorgado debido al pH del ácido fórmico, sin embargo se observa una buena interacción entre los componentes. Se observa la presencia de algunos puntos blancos asociados a la presencia de almidón [83][85]. Esta película presentó poca actividad ante mesofílicos aerobios, coliformes totales y hongos.



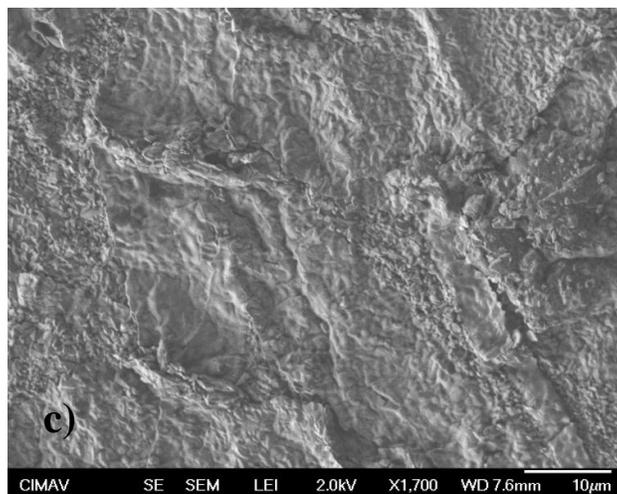
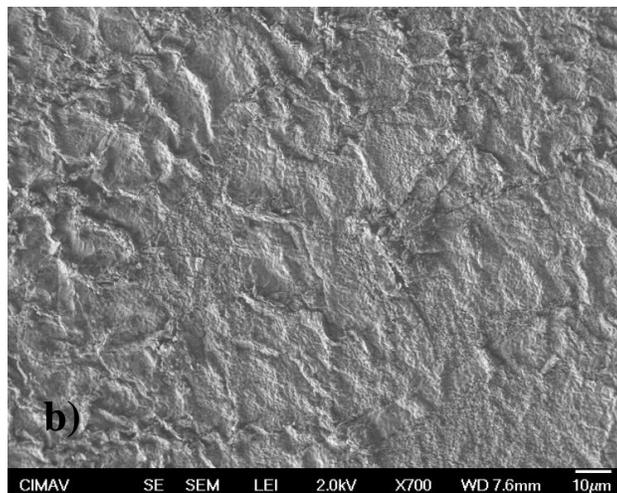


Figura 3.11 Micrografías de la película de quitosano – almidón QAf a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.

En la Figura 3.12 se muestran las imágenes obtenidas sobre la película de quitosano – almidón con extracto de fruto QAaF10. Se muestra una superficie en la que se presentan convexidades o montículos de diámetro regular sin separación de fases entre los polisacáridos, las cuales en su interior presentan estrías. Se observa en las convexidades la presencia de puntos blancos debido al almidón [83][85]. Esta película tuvo una actividad media frente a mesofílicos aerobios y coliformes totales.

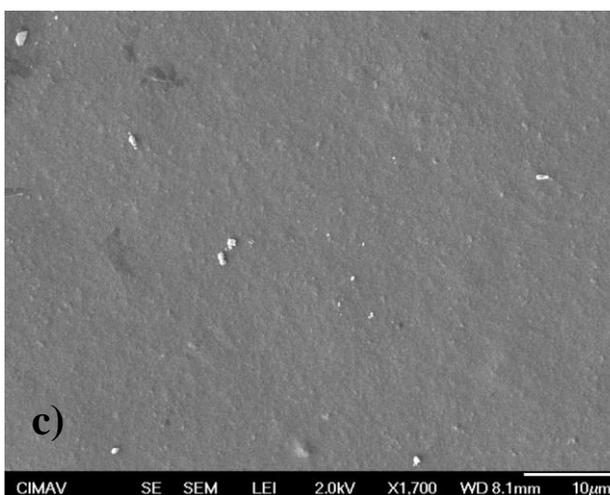
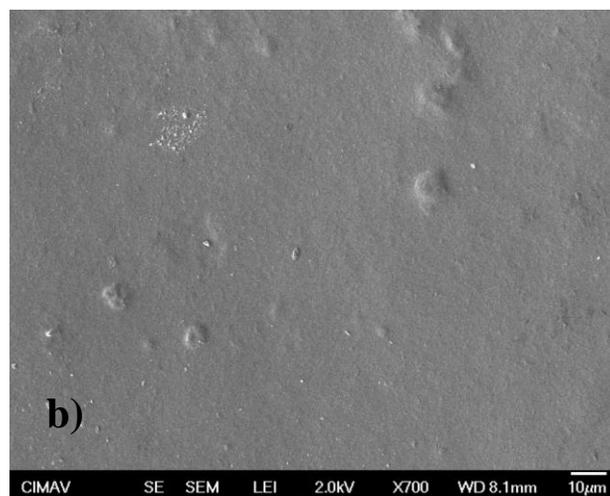
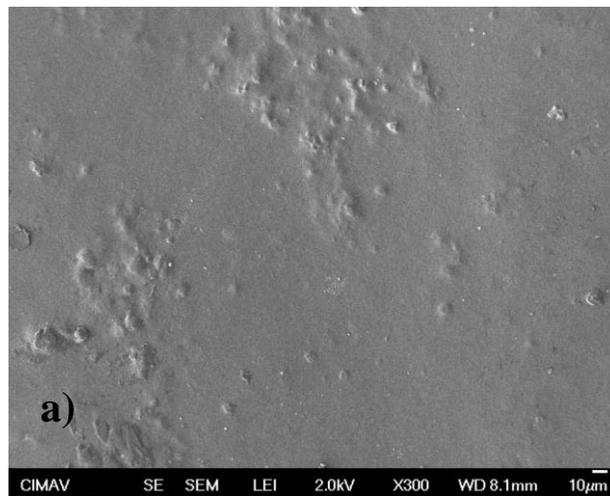
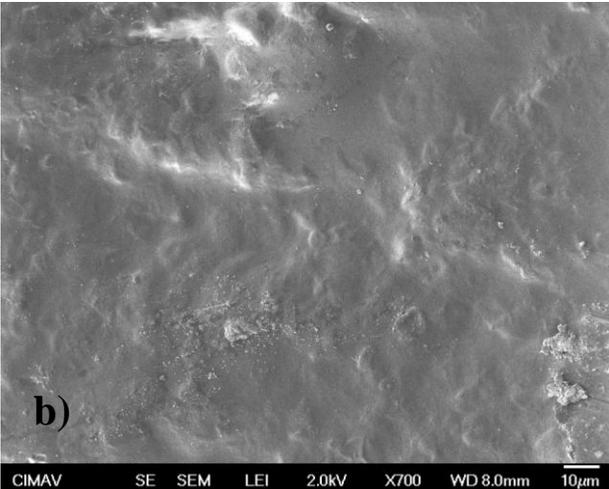
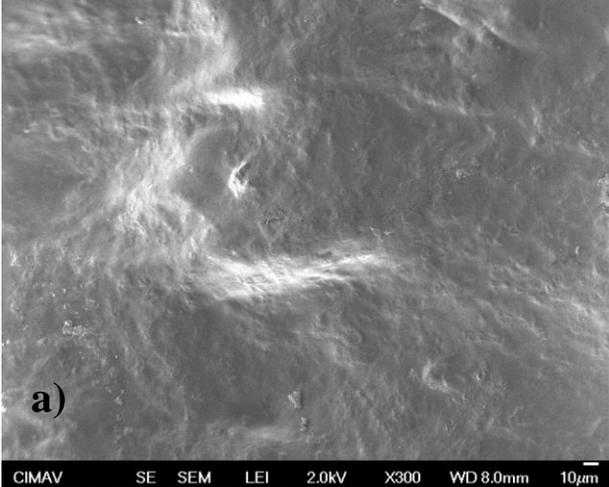


Figura 3.12 Micrografías de la película de quitosano – almidón QAaF10 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.

En la Figura 3.13 se muestran las imágenes obtenidas sobre la película de quitosano – almidón con extracto de hoja QAaH10. Se muestra una superficie con algunas concavidades de diámetro regular, con rugosidades. Se observa la presencia de puntos y estriados blancos, indicativos de la presencia de almidón [83][85]. Esta película tuvo una buena actividad frente a mesófilos aerobios y coliformes totales.



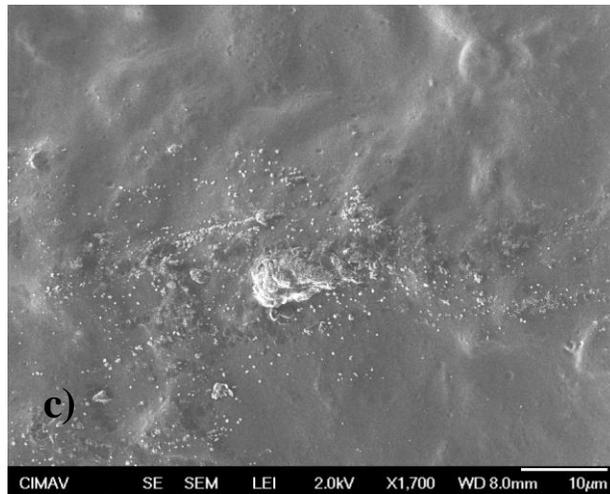
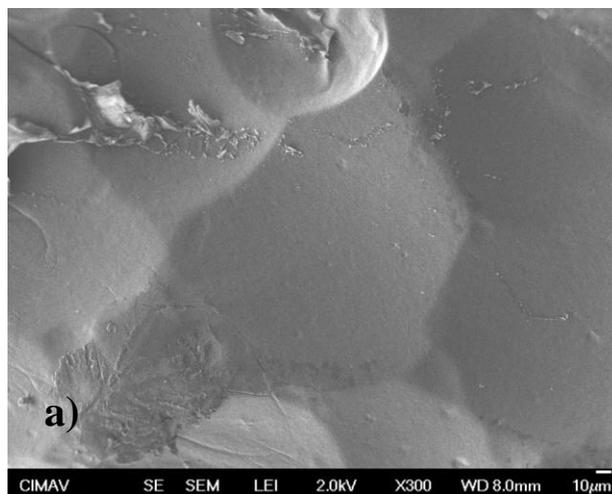


Figura 3.13 Micrografías de la película de quitosano – almidón QAaH10 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.

En la Figura 3.14 se muestran las imágenes obtenidas sobre la película de quitosano – almidón con extracto de fruto QAfF10 (en comparación con QAaF10). Se muestra una superficie en la que se presentan concavidades o depresiones así como también convexidades o montículos de diámetro considerable sin separación de fases entre los polisacáridos, las cuales en su interior presentan estrías, así como puntos blancos y un gránulo de almidón [83][86]. Esta película tuvo una buena actividad frente a coliformes totales.



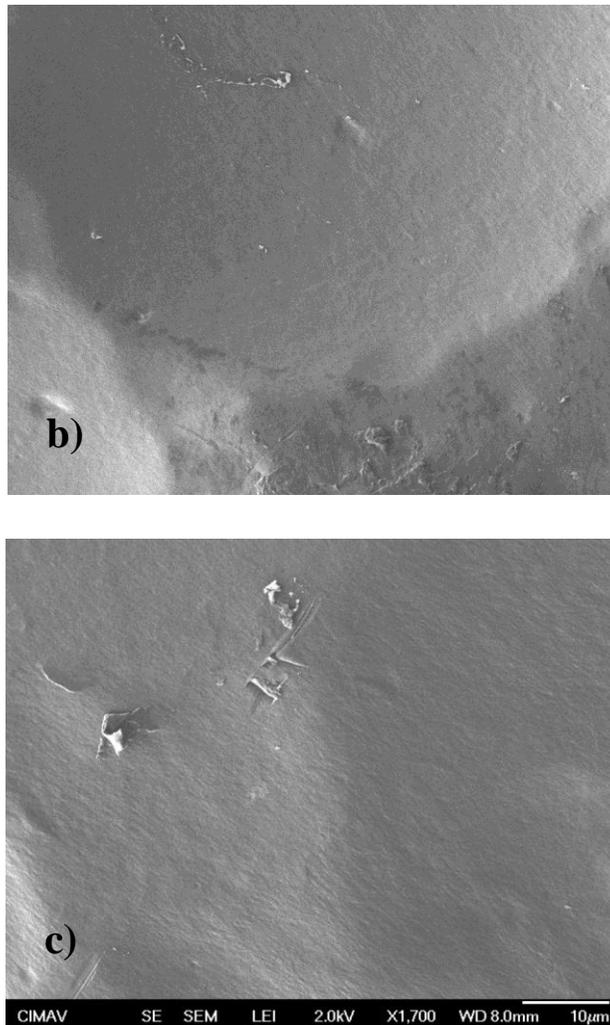


Figura 3.14 Micrografías de la película de quitosano – almidón QAfF10 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.

En la Figura 3.15 se muestran las imágenes obtenidas sobre la película de quitosano – almidón con extracto de hoja QAfH10. Se muestra una superficie en la que se presentan concavidades de diámetro considerable (en comparación con QAaH10), las cuales en su interior presentan estrías. Se observa la presencia de gránulos blancos, indicadores de la presencia de almidón [86]. Esta película tuvo una buena actividad contra mesofílicos aerobios y coliformes totales, una excelente actividad frente a hongos. Es de las mejores películas contra hongos.

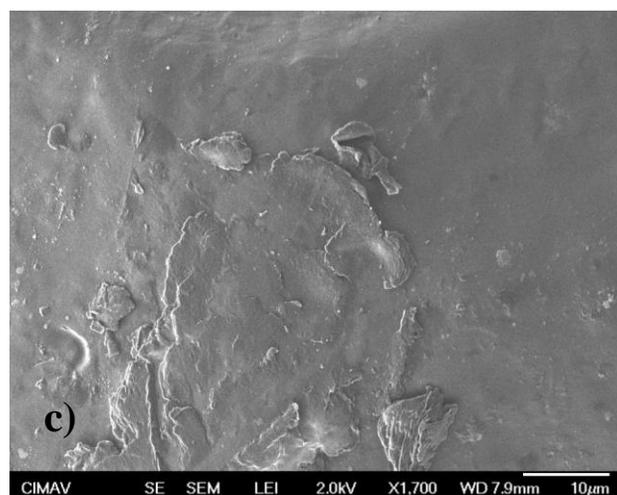
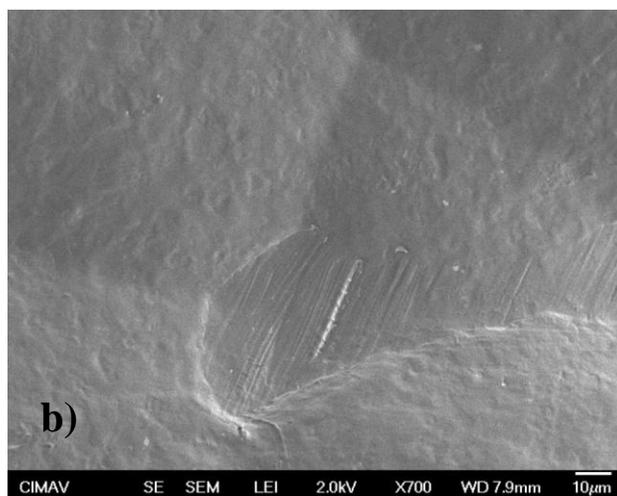
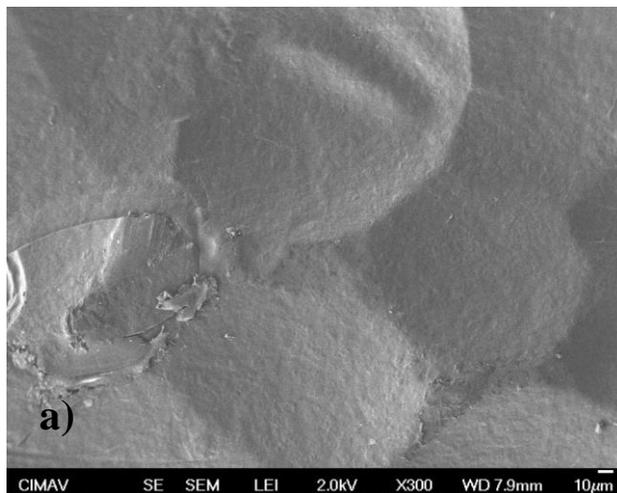
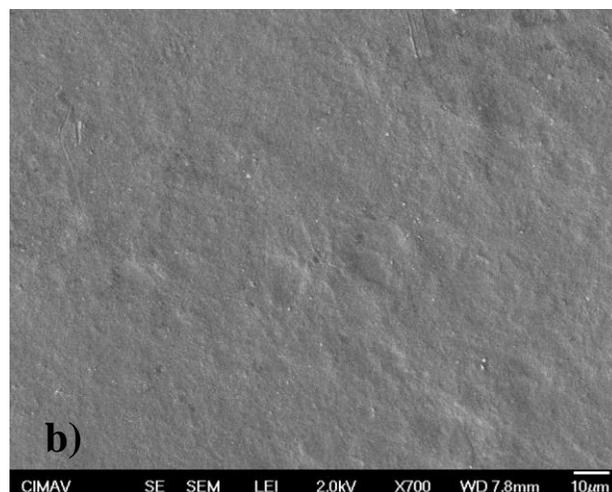
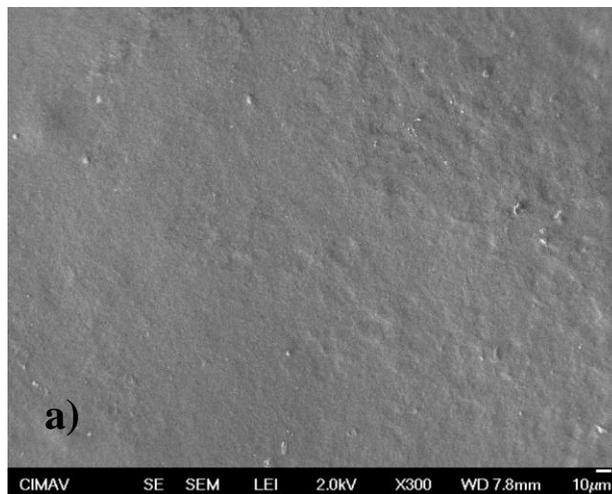


Figura 3.15 Micrografías de la película de quitosano – almidón QAfH0.5 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.

En la Figura 3.16 se muestran las imágenes obtenidas sobre la película de quitosano – almidón con extracto de hoja QAFH5. Se muestra una superficie en la que se presentan pequeñas concavidades de diámetro regular, las cuales presentan estrías en su interior. Esta película a una menor magnificación aparenta tener una superficie homogénea, tuvo una excelente actividad frente a mesofílicos aerobios, una buena actividad frente a coliformes totales y una actividad regular frente a hongos. Es la mejor película antimicrobiana con extracto de hoja. Sin embargo a simple vista parece una superficie casi lisa y homogénea, presenta gránulos blancos debido al almidón [83][85].



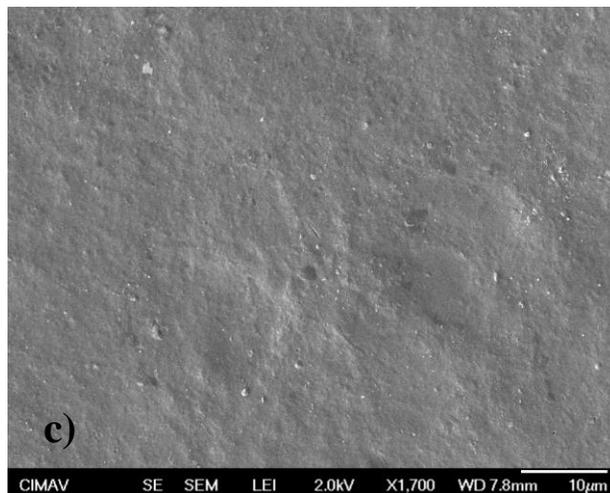


Figura 3.16 Micrografías de la película de quitosano – almidón QAFH5 a diferentes magnificaciones: a) 300x, b) 700x y c) 1700x.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Microscopia Electrónica de Barrido, se puede decir que el tipo de ácido y extracto modifican la morfología, dando un aspecto superficial no liso [83][85] y es más pronunciada por los extractos de hoja que por los de fruto.

3.9. Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la Figura 3.17 se observan las curvas TGA de las películas QAF, QAaF10, QAaH10, QAFH0.5, QAFH5 y QAF10. En cada curva TGA se presentan las pérdidas de peso o eventos térmicos. La primera pérdida de peso comprende desde la temperatura inicial hasta 160 °C aproximadamente y está asociada a la remoción de humedad y materiales volátiles, incluso la degradación de los fenoles probablemente ocurre después de los 100 °C. La segunda pérdida de peso ocurre entre 160 ° y 310 °C, se atribuye a la descomposición de las unidades amino del quitosano y la plastificación del almidón, así como a la descomposición del glicerol (la cual ocurre a 290 °C). La tercera pérdida de peso ocurre entre 310° y 600 °C, está relacionada con la descomposición del grupo $-CH_2OH$. La degradación total de los anillos de quitosano y almidón sucede a los 550 °C aproximadamente. Las muestras QAaF10, QAFH0.5 y QAF10, en comparación con las demás muestras, presentan un mayor desplazamiento al final de la curva lo que podría indicar una mayor plastificación en los materiales con extracto de hoja. Todas las curvas presentan una misma forma inicial causada por la acetilación del material, con excepción de QAFH5 [83].

La película QAfF10 presento la pérdida de peso total más baja, mostrando la mayor actividad antimicrobiana contra los coliformes totales.

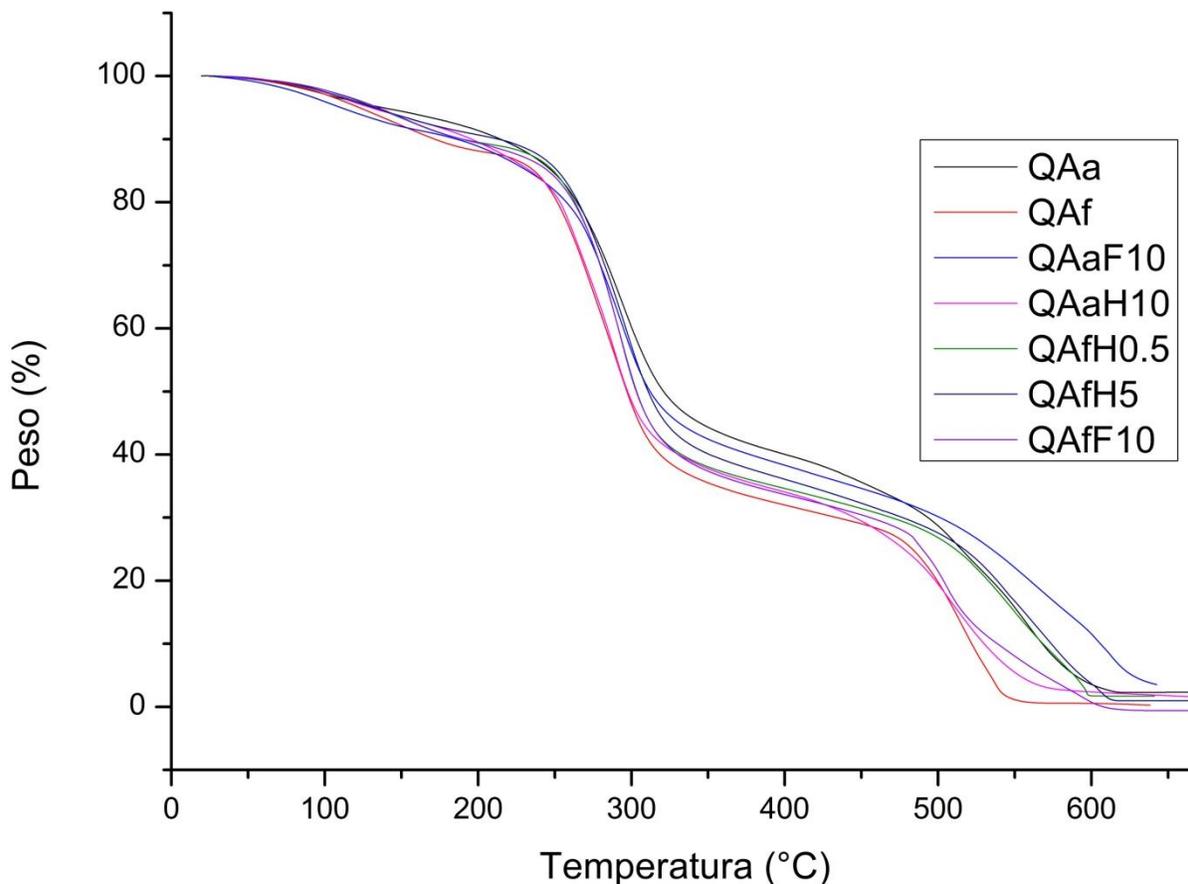


Figura 3.17 Termograma de las películas QAa, QAf, QAaF10, QAaH10, QAfH0.5, QAfH5 y QAfF10.

En la Tabla 3.10 se observan el porcentaje de pérdidas de peso de las películas QAaF10, QAaH10, QAfH0.5, QAfH5 y QAfF10.

Tabla 3.10 Porcentaje de pérdidas de peso.

Nomenclatura	Pérdida de peso a 160	Pérdida de peso a 310	Pérdida de peso a 600
	°C	°C	°C
QAaF10	8.54	49.10	98.04
QAaH10	7.09	55.86	97.65
QAfH0.5	7.65	54.01	98.27
QAfH5	7.09	49.56	96.35
QAfF10	7.59	53.99	99.27

3.10. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En la Figura 3.18 se observa la Resonancia Magnética Nuclear del extracto de hoja del *Melicoccus Bijugatus*, en el cual se observan señales de un triplete entre 1.2 y 1.3 ppm aproximadamente, un singulete entre 1.6 y 2.0 ppm, un cuadruplete entre 3.6 y 3.8 ppm, señal entre 7.0 y 7.5 ppm [87][88]. Estos resultados son aportes de mi investigación al estudio de la hoja de este árbol exótico tropical ya que este análisis no se ha hecho previamente.

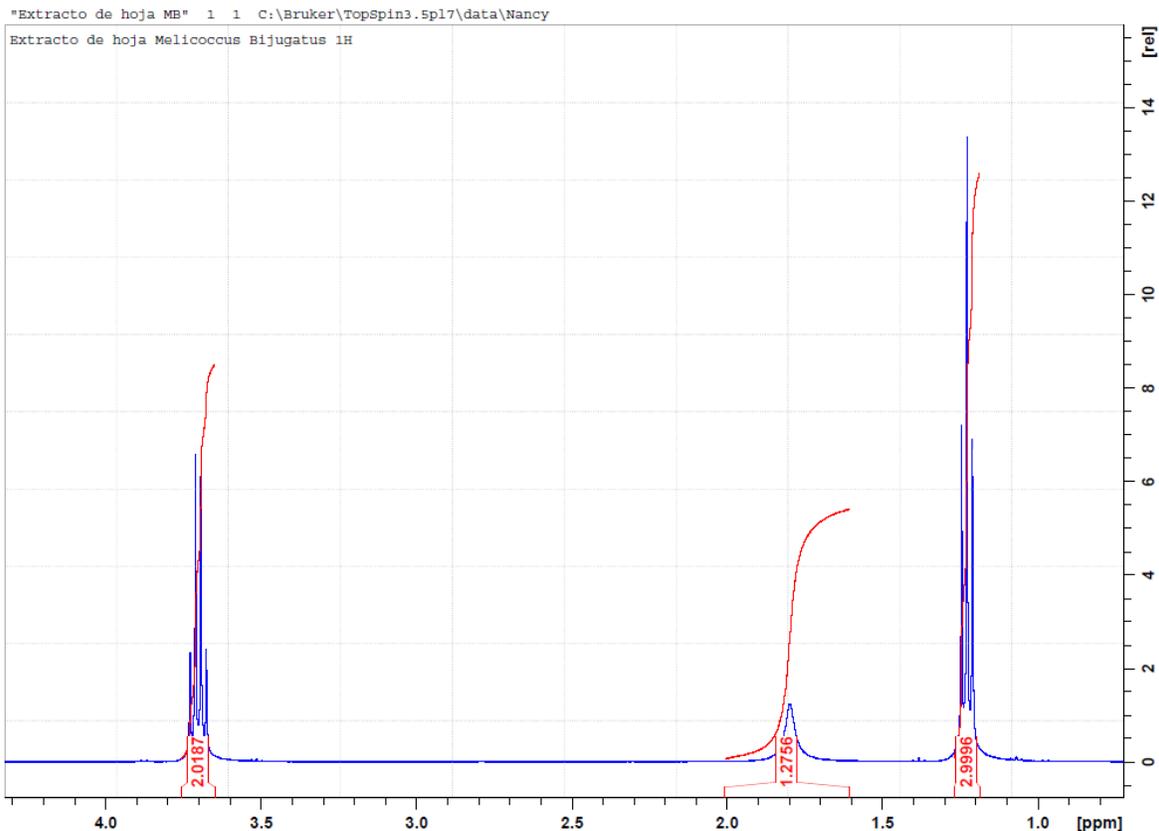


Figura 3.18 Espectro ^1H RMN de extracto de hoja de *Melicoccus Bijugatus*.

En la Figura 3.19 se observa el espectro RMN ^1H del extracto de fruto del *Melicoccus Bijugatus*, en el cual se observan señales entre 3.5 y 4.5 ppm indicando azúcares y picos por debajo de 3 ppm indicando orgánicos y aminoácidos, confirmando la presencia de compuestos fenólicos con picos alrededor de 4.5 y 8 ppm en el que es probable que se encuentren dobles ligaduras y anillos aromáticos, presentando en el espectro un desplazamiento de señales entre 1 y 4.5 ppm por

grupos funcionales de aminos, desplazamiento aproximado ente 4.7 y 5.5 asociado a fenoles [43][87][88].

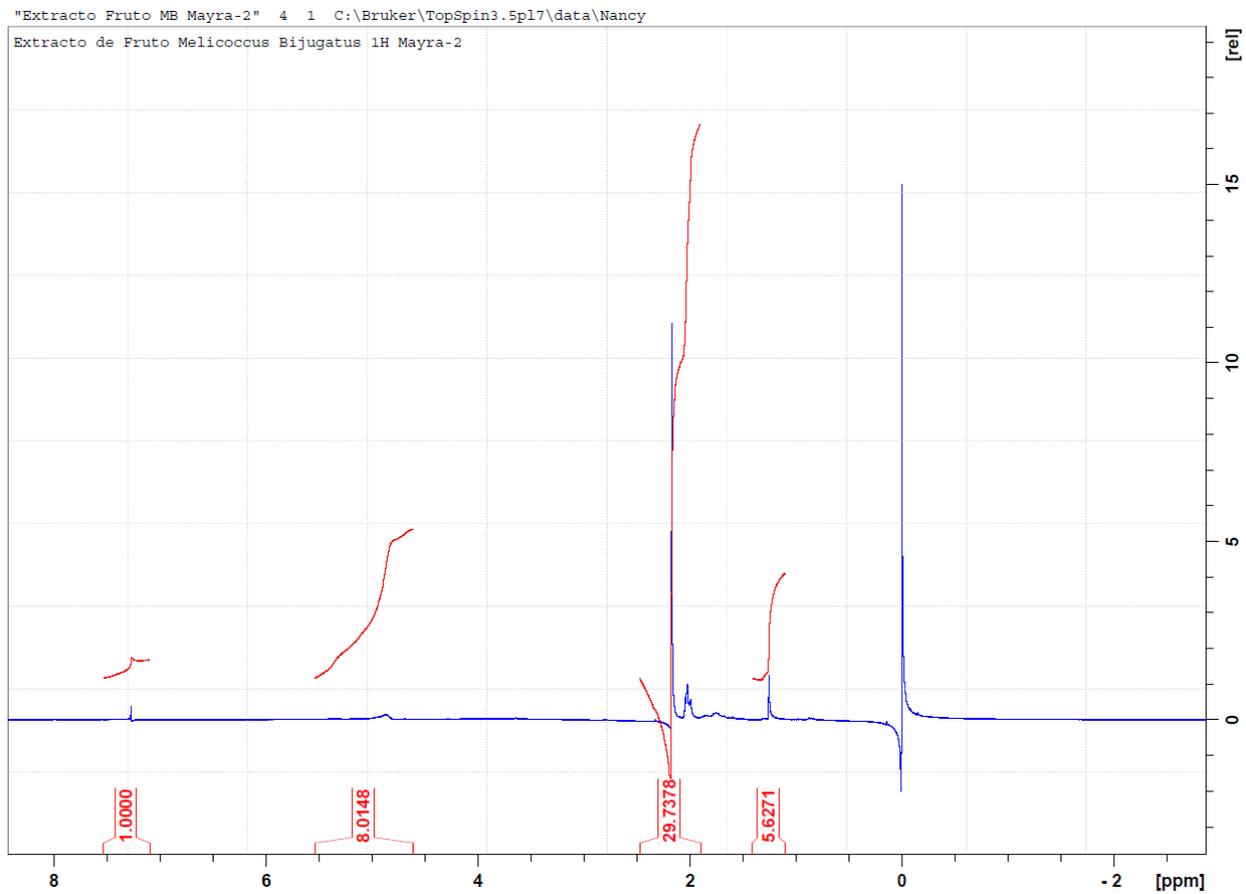


Figura 3.19 Espectro ^1H RMN de extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*.

3.11. Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CGEM).

En la Figura 3.20 se observa el cromatograma del extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* en el cual se muestran las señales de composición indicadas en la Tabla 3.11 y mencionadas posteriormente.

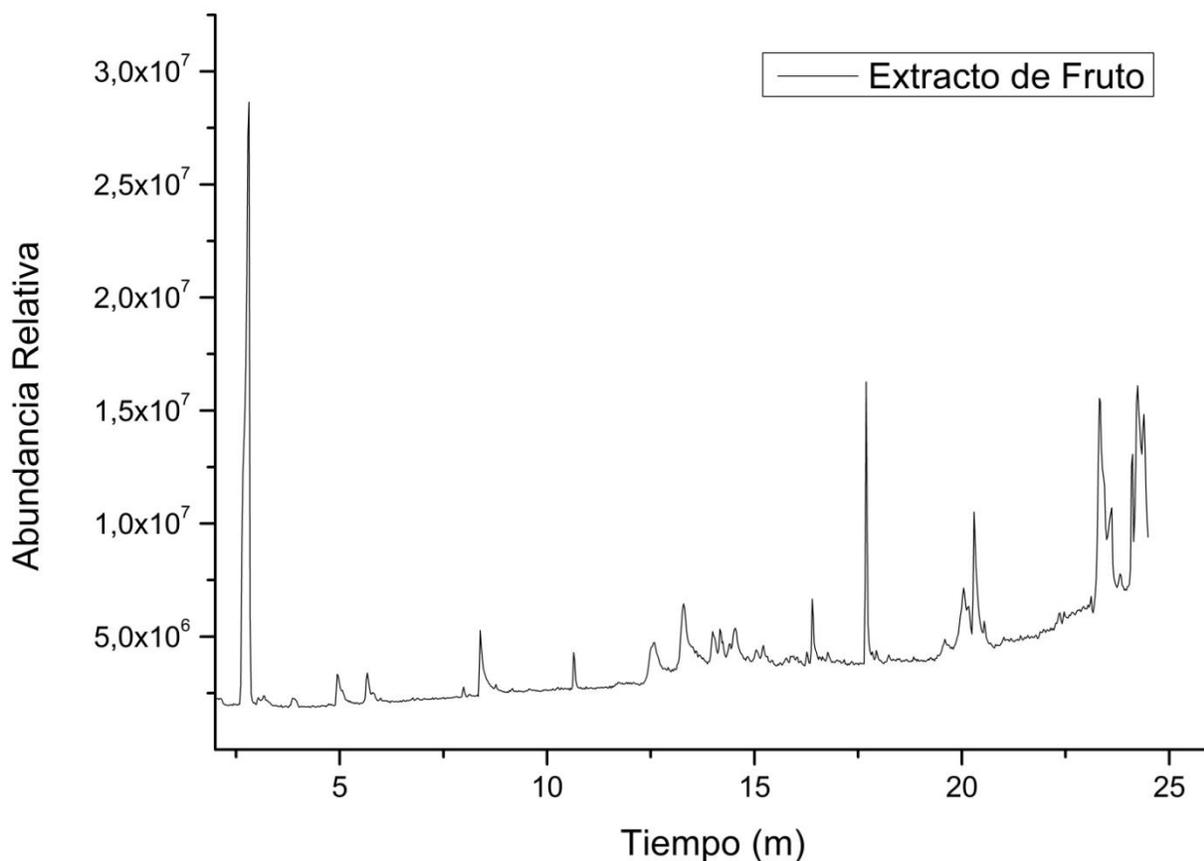


Figura 3.20 Cromatograma del extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*.

En la Tabla 3.11 se muestra la composición del extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*, entre sus componentes se encuentra: el ácido 2-oxo-propanoicoetilester conocido como ácido pirúvico que es un compuesto orgánico clave en el metabolismo, es el producto final de la glucólisis; furfural, es un aldehído aromático, con una estructura en anillo, usado como base química de herbicidas, fungicidas e insecticidas; 1,3,5-triacina-2,4,6-triamina conocido como melanina, es

una aminorresina; ácido 9,12,15-octadecatrienoicoetilester, es un ácido graso poliinsaturado esencial de la serie omega 3.

Tabla 3.11 Composición de extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*.

Tiempo (m)	Componente	Área	%AR
2.81	Propilenglicol	3,297,576.00	29.43
4.94	Ácido fórmico	156,649.00	1.40
5.66	Ácido acético	163,552.00	1.46
8.39	Ácido 2-oxo-propanoicoetilester*	405,251.00	3.62
10.64	Furfural	96,365.00	0.86
12.59	1,3-propanodiamina	427,839.00	3.82
13.29	1,2,4-trimetilbenceno	540,711.00	4.83
14.54	1,3,8-p-mentatrieno*	252,201.00	2.25
16.39	1,3,5-triacina-2,4,6-triamina*	180,080.00	1.61
17.69	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	580,751.00	5.18
20.04	Ácido 9-bromononaicoetilester*	372,757.00	3.33
20.29	5-hidroximetilfurfural	482,671.00	4.31
23.32	Ácido 9,12-octadecadienoico	1,909,964.00	17.05
24.24	Ácido 9,12,15-octadecatrienoicoetilester*	2,336,591.00	20.86
	*<80% correlación contra biblioteca NIST	TOTAL	100.00

En la Figura 3.21 se observa el cromatograma del extracto de hoja de *Melicoccus Bijugatus* en el cual se muestran las señales de composición indicadas en la Tabla 3.12 y mencionadas posteriormente.

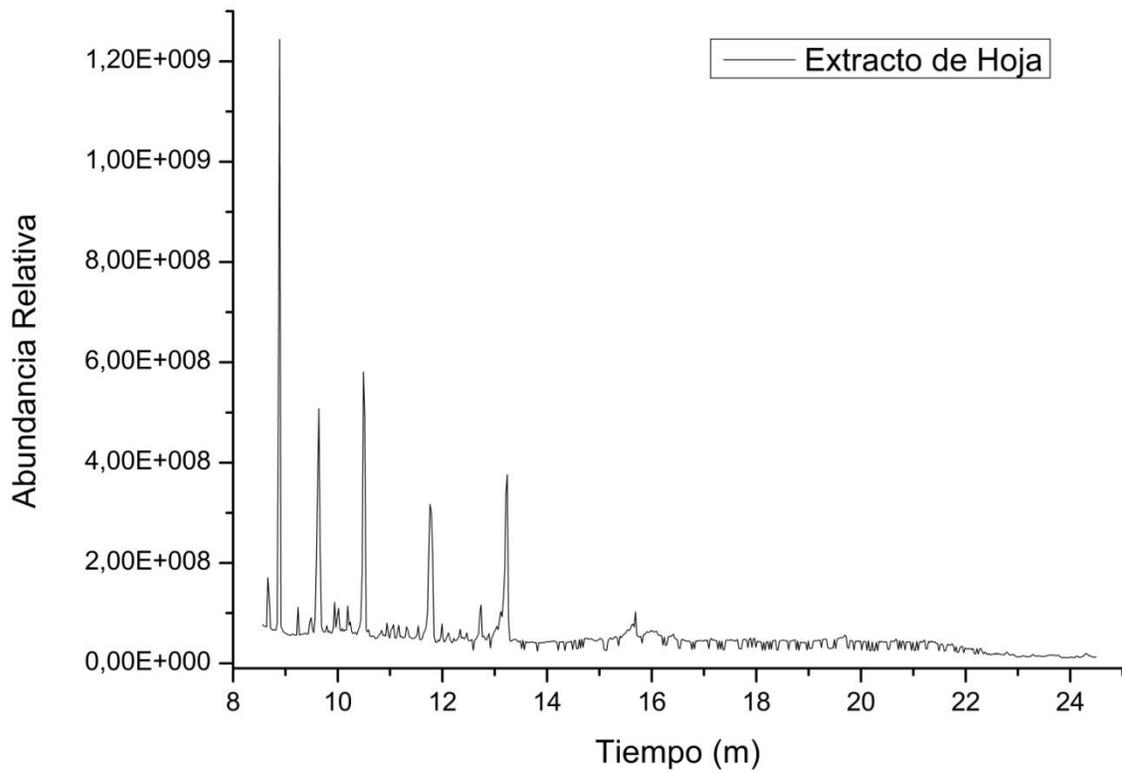


Figura 3.21 Cromatograma de extracto de hoja

En la Tabla 3.12 se muestra la composición del extracto de hoja de *Melicoccus Bijugatus*, entre sus componentes se encuentra: el ácido 3,3-dimetilmetilesterbutanoico, 5-metil-2-hexanol, ácido 3-etoxietilesterpropanoico y ácido acético que son ácidos carboxílicos; ácido 2,2-dietilbutanoico, conocido como ácido isovalérico clasificado como ácido graso; D-Limoneno, es un terpeno usado como disolvente biodegradable y le proporciona al *Melicoccus Bijugatus* su característico aroma cítrico similar al limón,. La mejora antibacteriana y antifúngica de los extractos de hoja del *Melicoccus Bijugatus*, se debe al componente activo que posee y entre los que destaca el limoneno [89].

Tabla 3.12 Composición de extracto de hoja de *Melicoccus Bijugatus*.

Tiempo (m)	Componente	Área	%AR
8.66	Anhídrido tiodiglicólico	4,119,257.00	2.15%
8.89	Ácido acético	42,811,744.00	22.38%
9.24	2-penten-1-ol	1,408,879.00	0.74%
9.49	Ácido 3,3-dimetilmetilesterbutanoico*	1,596,201.00	0.83%
9.64	Ácido propenoico	27,206,724.00	14.22%
9.94	5-metil-2-hexanol*	3,948,115.00	2.06%
10.02	Ácido 2,2-dietilbutanoico*	1,901,980.00	0.99%
10.19	Trimetilfosfina*	2,170,167.00	1.13%
10.49	1,1-dietoxi-2-metilpropano	29,116,548.00	15.22%
11.77	1,1-dietoxi-3-metilbutano	25,875,146.00	13.53%
12.74	Ácido 3-etoxietilesterpropanoico	9,925,839.00	5.19%
13.24	D-limoneno	38,234,308.00	19.99%
15.69	5-etoxidihidro-2(3H)-furanona	2,947,817.00	1.54%
* < 80% correlación contra biblioteca NIST		TOTAL	100.00%

En la Figura 3.22 se observa el cromatograma de la película con extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus* (QAfF10) en el cual se muestran las señales de composición, indicado en la Tabla 3.13 y mencionados posteriormente.

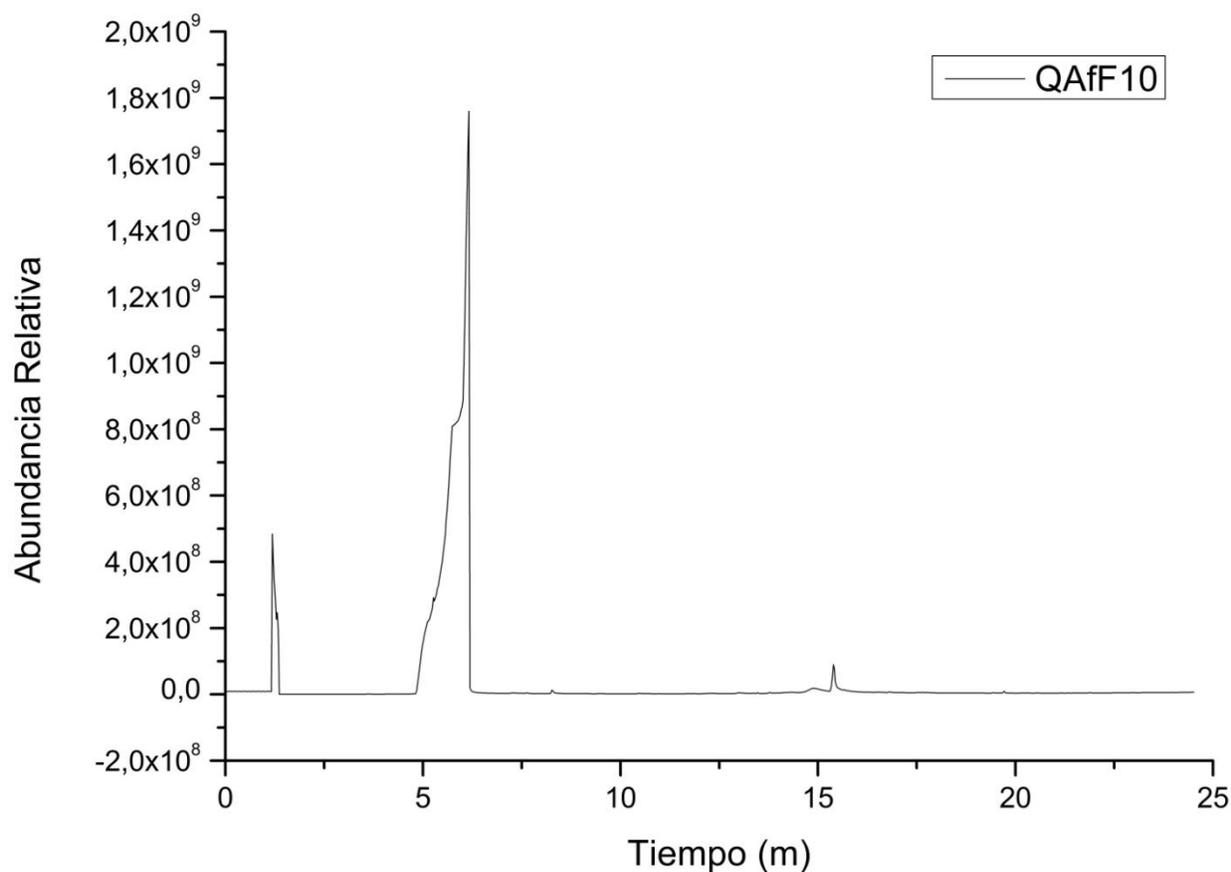


Figura 3.22 Cromatograma de Película de quitosano – almidón QAfF10.

En la Tabla 3.13 se muestra la composición de la película con extracto de fruto de *Melicoccus Bijugatus*, entre sus componentes se encuentra: ácido acético, ácido 3-acetil-2-metilpropanoico, ácido succínico di (3-fenilprop-2-en-1-il) éster, que son ácidos carboxílicos [90].

Tabla 3.13 Composición de película de quitosano – almidón QAfF10.

Tiempo (m)	Componente	Área	%AR
1.19	Etanol	45,815,268.00	6.52%
6.16	Ácido acético	644,550,464.00	91.73%
8.26	Ácido 3-acetil-2-metilpropanoico*	878,163.00	0.12%
14.92	Ácido succínico di(3-fenilprop-2-en-1-il) ester*	3,546,614.00	0.50%
15.39	Glicerina	7,434,712.00	1.06%
19.44	Ácido nonanoico	137,708.00	0.02%
19.72	2,3-dihidrobenzofurano	261,069.00	0.04%
*<80% correlación contra biblioteca NIST		TOTAL	100.00%

En la Figura 3.23 se observa el cromatograma de la película con extracto de hoja de *Melicoccus Bijugatus* (QAfH10) en el cual se muestran las señales de composición, indicados en la Tabla 3.14 y mencionados posteriormente.

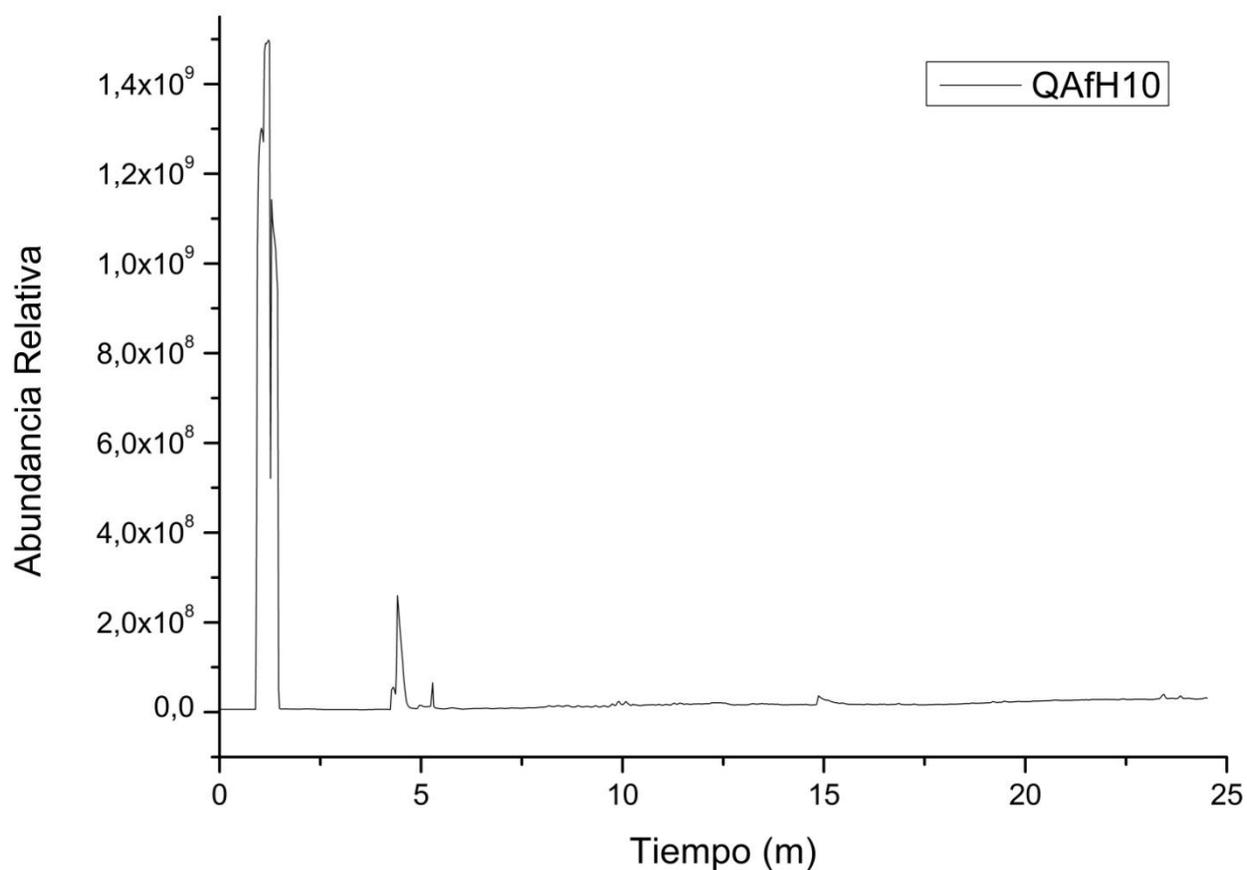


Figura 3.23 Cromatograma de película de quitosano – almidón QAfH10.

En la Tabla 3.14 se muestra la composición de la película con extracto de hoja de *Melicoccus Bijugatus*, entre sus componentes se encuentran: ácido fórmico, ácido acético, que son ácidos carboxílicos; 1, 2, 3-trimetilbenceno, es un hidrocarburo aromático; ácido hexadecanoico etilester conocido como ácido palmítico, que es un ácido graso saturado.

Tabla 3.14 Composición de película de quitosano- almidón QAfH10.

Tiempo (m)	Componente	Área	%AR
1.21	Etanol	642,276,800.00	92.19%
4.41	Ácido fórmico	38,289,980.00	5.50%
5.29	Ácido acético	2,491,404.00	0.36%
10.09	1,2,3-trimetilbenceno	5,117,283.00	0.73%
14.87	Glicerina	6,089,791.00	0.87%
19.22	Ácido benzoico 4-hidroxi-3-metoxietilester	202,409.00	0.03%
23.44	Ácido hexadecanoicoetilester	1,721,975.00	0.25%
23.87	Neofitadieno	491,280.00	0.07%
		TOTAL	100.00%

Conclusiones y Recomendaciones.

En las pruebas previas y antimicrobianas se muestra que las películas elaboradas con ácido fórmico y ácido acético - extracto de hoja dieron mejores resultados que las películas con extracto de fruto. Esto es debido a que el contenido polifenólico en las hojas es más alto que en el fruto.

Las películas elaboradas con extracto de hoja y ácido acético tienen buena actividad antibacteriana. Las películas elaboradas con extracto de fruto y ácido fórmico tuvieron una efectividad media. Las películas elaboradas con extracto de fruto y ácido acético tuvieron poca actividad antimicrobiana, esto pudiera deberse a los azúcares presentes.

En la medición de espesor se mostró que las películas elaboradas con ácido acético y ácido fórmico - extracto de hoja presentaron un aumento de espesor conforme se incrementó la concentración del extracto, en comparación con las películas elaboradas con ácido acético y ácido fórmico - extracto de fruto presentaron una disminución de espesor en las concentraciones de 0.5 y 5%, aumentando en las películas con concentración del 10%.

Las películas que dieron valores menores de % de transmitancia, son las elaboradas con ácido acético, indicativo de mejores propiedades de barrera de luz UV y natural. Todas las películas presentaron valores menores de transparencia en contraposición de la película control. Las películas que presentaron valores menores de transparencia son las películas elaboradas con ácido fórmico, en contraposición de la película control. Esto indica que la adición de extractos mejora las propiedades de barrera de luz potencializándose en las películas elaboradas con ácido fórmico, lo que permitiría la mejor conservación de alimentos, evitando fenómenos de descomposición.

Con base a los resultados obtenidos en los análisis EITF realizados a las muestras de las películas, se concluye que no existen diferencias significativas en los espectros EITF que confirmen los antioxidantes, estos pueden verse en el color, capacidad antioxidante, etc. Ya que los espectros IR en las películas son idénticos debido a que el quitosano y el almidón presentan enlaces muy parecidos. La banda a 3200 cm^{-1} aproximadamente es ancha esto debido a los enlaces OH indicativo de la presencia de azúcares, agua, ácidos carboxílicos, etc. En 2940 cm^{-1} las películas con extracto y ácido acético se presenta un estiramiento C-H que indica la presencia

grupos carbonilos asociados al ácido acético y ácido fórmico, a 1570 cm^{-1} se tiene una vibración de enlace N-H que corresponde al grupo amino, en las películas con extracto de hoja se indica la presencia de una banda de tensión O-H a 3270 cm^{-1} , hay una banda de tensión a 1153 cm^{-1} aproximadamente que indica la presencia de fenoles, estando menos pronunciada que en las películas de fruto, a 570 cm^{-1} se observa una vibración de torsión de enlace C-OH.

En los resultados obtenidos en los análisis MEB, se concluyó que no parece existir una relación concluyente entre actividad antimicrobiana y la morfología en las películas analizadas.

En los resultados obtenidos en los análisis TGA realizados a las muestras QAFH0.5, QAFH5 y QAaF10, en comparación con la muestra QAaH10, presentan un mayor desplazamiento al final de la curva lo que podría indicar una mayor plastificación en los materiales con extracto de hoja. Todas las curvas presentan una misma forma inicial debida a la acetilación del material, con excepción de QAFH5. De las películas analizadas QAaH10, QAFH5 y QAF10 tienen menores pérdidas de peso y presentaron una buena actividad antimicrobiana. La estabilidad térmica mejor debido a una mayor plastificación en los materiales con extracto de hoja.

Con base a los resultados obtenidos en el análisis RMN al extracto de hoja y al extracto de fruto, se observaron señales en las que se encuentran dobles ligaduras y anillos aromáticos, presentando en el espectro un desplazamiento de señales entre 1 y 4.5 ppm por grupos funcionales de aminos, entre 3.5 y 4.5 azúcares, picos por debajo de 3 ppm indicando grupos orgánicos y grupos aminoácidos confirmando la presencia de compuestos fenólicos con picos alrededor de 4.5 y 8 ppm, confirmando que hay antioxidantes.

En los cromatogramas obtenidos de los análisis CGEM en el extracto de fruto se encontraron principalmente componentes de tipo fenólico como los ácidos carboxílicos, el ácido 2-oxo-propanoicoetilester conocido como ácido pirúvico que es el producto final de la glucólisis; furfural, es un aldehído aromático, usado como base química de herbicidas, fungicidas e insecticidas; ácido 9,12,15-octadecatrienoicoetilester, es un ácido graso poliinsaturado esencial de la serie omega 3, en el extracto de hoja se encontró principalmente D-Limoneno, que es un terpeno usado como disolvente biodegradable, como insecticida para repeler insectos principalmente, por su poca miscibilidad con el agua es empleado como desengrasante y le proporciona al *Melicoccus Bijugatus* su característico olor a limón.

Las películas que presentaron mayor capacidad antioxidante son QAfH10, QAaF0.5 y QAaF5. Siendo QAfH10 la película que funciono mejor en las pruebas antimicrobianas, mayor espesor promedio, con uno de los más bajos valores de pH y reducción muy significativa en los valores de transparencia, % Transmitancia, así como aumento en opacidad.

En los resultados obtenidos en la determinación de antioxidantes, se observa que las películas que presentan una mayor capacidad antioxidante son QAfH10, QAaF0.5 y QAaF5. Siendo QAfH10 la película que funciono mejor en las pruebas antimicrobianas, presentando mayor espesor promedio debido a la concentración del extracto, de los valores de pH y reducción muy significativa en los valores de transparencia, % Transmitancia, así como aumento en opacidad, que se relacionan con la actividad antimicrobiana.

Considerando todos los resultados presentado se recomienda que las mejores películas QAfH10, QAaF5 y QAfH10 puedan ser utilizadas como embalajes de alimentos, esto debido a que inhiben los microorganismos, teniendo la posibilidad de prolongar la vida útil de los alimentos ya que tienen las propiedades como baja transparencia, buena opacidad y actividad antimicrobiana, aunado a esto se podrían realizar pruebas de % solubilidad, contenido de agua, DMA y de hinchamiento, para determinar si podría aplicarse en hidrocarburos.

Fuentes de información.

- [1] Lozano N, J. I; Díaz Z, N. P; Velasco S, C.; Antimicrobial, Optical and Mechanical Properties of Chitosan – Starch films with Natural Extracts, *Internacional Journal of Molecular Sciences*, mayo 2017.
- [2] García, R. “Almidón modificado: Propiedades y usos como recubrimientos comestibles para la conservación de frutas y hortalizas frescas,” *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 19, pp. 30–44, 2018.
- [3] Alarcón-Cavero, E.; Arroyo-Benítez, H. A. “Evaluación de las propiedades químicas y mecánicas de biopolímeros a partir del almidón modificado de la papa,” *Rev Soc Quím Perú*, vol. 82, no. 3, pp. 315–323, 2016.
- [4] Rodríguez-Marín, R. A.; Bello-Pérez, M.L; Yee-Madeira, L.A; González-Soto, H. “Propiedades Mecánicas Y De Barrera De Películas Elaboradas Con Harina De Arroz Y Plátano Reforzadas Con Nanopartículas: Estudio Con Superficie De Respuesta,” *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 12, pp. 168–170, 2013.
- [5] Dash, M., F. Chiellini, R.M. Ottenbrite y E. Chiellini (2015). Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical *Progress in polymer science*, 36:981-1014. Propiedades, Obtención, Caracterización y Aplicaciones del Quitosano.
- [6] Cruañes M. and Locaso D., “Quitosano: Antimicrobiano biodegradable en postcosecha de arándanos (*Vaccinium myrtillus* L.),” *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 12, no. 1, pp. 57–63, 2011.
- [7] Garde Izquierdo, G., (2014). Tesis de maestría, Efecto de la adición, tipo y concentración de nanoarcilla sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas biodegradables basadas en quitosano.
- [8] García Q, A.V, “Obtención de un Polímero Biodegradable a partir de Almidón De Maíz.” 2015. 1er edición, San Salvador, El Salvador, ITCA Editores, ISBN: 978-99961-50-21-0.
- [9] Agulló, E.; Rodríguez, M.; Ramos, V.; Albertengo L. 2003. Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromol. Biosci.* 3, 521-230.
- [10] Majeti, N.; Kumar, R. 2000. A review: chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46(1), 1-27
- [11] Yamakawa, H. (2001). *Modern theory of polymer solutions*. Harper & Row Publishers Inc, Electronic edition.
- [12] Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química*, volumen 1, número 2, pp. 15-21.

- [13] Rodríguez D, Y. J.; De la cruz F, G. A.; López M, W. E.; (2015) Uso de un polímero natural (quitosano) como coagulante durante el tratamiento de agua para consumo.
- [14] Rinaudo, M. (2006). Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31:603-632.
- [15] Kim Ki Myong, Son Jeong Hwa, Kim Suung –Koo, Properties of Chitosan films as a function of pH and solvent type, 2006.
- [16] Rhazi, M.; Desbrieres, J.; Tolaimate, A.; Alagui, A.; Vottero, P. 2004. Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *PolymerInt.* 49(4), 337- 344.
- [17] Ravindra, R., Krovvidi Kameswara y Khan A.A (1998). Solubility parameter of chitin and chitosan. *Carbohydrate polymers*, 36:121-127.
- [18] Goycoolea, F.M., W. Aguelles, C. Peniche y I. Higuera (2000). Chitin and chitosan. Elsevier Science B.V., Electronic edition.
- [19] Franklin, T.J., Snow G.A., 1981. *Biochemistry of Antimicrobial Action*; 3rd ed.; Chapman and Hall: London, pp. 217.
- [20] Romanazzi, G.; Nigro, F.; Ippolito, A.; Divenere, D.; Salerno, M. 2002. Effect of pre- and post harvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *J. Food Sci.* 67(5), 1862-1867.
- [21] Henriksen, I.; Green, K.; Smart, J.; Smistad, G; Karlsen, J. 1996. Bioadhesion of hydrated chitosans: an in vitro and in vivo study. *Int. J. Pharm.* 145, 231-40.
- [22] Raafat, D.; Sahl, H. 2009. Chitosan and its antimicrobial potential-a critical literature survey. *Microb. Biotechnol.* 2, 186-201.
- [23] Wiles, J.; Vergano, P.; Barron, F.; Bunn, J.; Testin, R. 2000. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *J. Food Sci.* 65(7), 1175-1179.
- [24] Park, S.; Marsh, K.; Rhim, J. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films, affected by the type of organic solvents. *J. Food Sci.* 67(1), 194-197.
- [25] Aider, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-FoodSci. Technol.* 43, 837-842.
- [26] Mead PS., Slutzker, L., Dietz, V., Mccaig, LF., Bresee, JS., Shapiro, C., Griffin, PM., Tauxe, RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis*; 5: 607–625.
- [27] Wang, G. 1992. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Food Prot.* 55, 916-919.

- [28] Yang, T-C.; Li, C-F.; Chou, C-C. 2007. Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 258-262.
- [29] Doyle, M. 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 289-302.
- [30] Smith, H. 1997. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 cause for concern. *Soc. Gen. Microbiol. Q.* 24, 54-55.
- [31] Li, B.; Kennedy, J.; Peng, J.; Yie, X.; Xie, B. 2006. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydr. Polym.* 65(4), 488-494.
- [32] Tsai, G.; Su, W.; Chen, H.; Pan, C. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fish. Sci.* 68, 170-177.
- [33] Jeon, Y.; Park, P.; Kim, S. 2001. Antimicrobial effect of chito-oligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym.* 44, 71-76.
- [34] No, H.; Meyers, S.; Prinyawiwatkul, W.; Xu, Z. 2007. Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *J. Food Sci.* 72(5), 87-100.
- [35] López A, y col. (2008) Chemical-genetic approaches for exploring the mode of action of natural products. *Prog Drug Res*66:237, 239-71
- [36] Bello-Pérez, L.A., Paredes-López, O. (1999). El almidón: lo comemos pero no lo conocemos. *Ciencia.* 50: 29-33.
- [37] Lourdin, D., G. Della Valle, and P. Colonna. 1995. Influence of amylase content on starch films and foams. *Carbohydr. Polym.* 27: 261-270.
- [38] Tan I.E. y otros autores. (2004). Estimating the specific heat capacity of starch-water-glycerol systems as a function of temperature and compositions, *starch (starke)* 56 (1), 6-12
- [39] Martínez; Jader y Hernández, Jennifer, Arias, Anlly (2017). Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de arroz (*Oryza Sativa* L) blanco e integral.
- [40] Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, FAO, 2005
- [41] Bof, M. J., Bordagaray, V. C., Locaso, D. E., & García, M. A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch – composite film properties. *Food Hydrocolloid*, 51: 281 – 294.
- [42] *Melicoccus bijugatus* Jacq. Quenepa. Sapindaceae. Soapberry family. J. K. Francis, 1992 SO-ITF-SM, 48 New Orleans, LA: USDA Forest Service, Southern Forest Experiment Station, Institute of Tropical Forestry; 4 p.

- [43] Bystrom, Laura M., Lewis, Betty A., Brown, Dan L., Rodríguez, Eloy, Obendorf, Ralph L. Phenolics, sugar, Antimicrobial and free radical scavenging activities of *Melicoccus bijugatus* Jacq. Fruits from the Dominican Republic and Florida, 2009
- [44] Zoolemfer, 1994. *Melicoccus bijugatus* Jacq,
- [45] Métodos de la industria química: en esquemas de flujo en colores. Dr. Ludwig Mayer – Hermülheim parte 2: orgánica, editorial Reverté 1987. <https://books.google.com.mx/books?id=gXy0D6vWx7EC&pg=PA87&lpg=PA87&dq=El+%C3%A1cido+ac%C3%A9tico+es+un+%C3%ADquido+incoloro+como+el+agua,+con+olor+penetrante+y+que+irrita+la+piel.&source=bl&ots=1mtf1j7EKz&sig=ACfU3U0annhbdiXE5GVsbt2KIBIYS3wXg&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwifrdLE74DiAhVI6wKHTTSCMIQ6AEwBXoECAKQAQ#v=onepage&q=El%20%C3%A1cido%20ac%C3%A9tico%20es%20un%20%C3%ADquido%20incoloro%20como%20el%20agua%20con%20olor%20penetrante%20y%20que%20irrita%20la%20piel.&f=false> pagina 87.
- [46] Ácido fórmico <https://www.pochteca.com.mx/productosmp/acido-formico/>.
- [47] Lisethy Hernández Nazario; María Magdalena Quintana Cabrales; Humberto Joaquín Morris Quevedo; Obtención de Glicerol a partir de la microalga *Dunaliella Salina*, Revista Cubana de Farmacia, Vol. 34, Núm. 2, mayo-agosto 2000, pág. 134-137.
- [48] Mario Pagliaro; Rosaria Ciriminna; Hiroshi Kimura; Michele Rossi; Cristina Della Pina; From Glycerol to Value-Added Products, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 46, Núm. 24, junio 2007, pág. 4434-4440.
- [49] Marino Lavorgna; Filomena Piscitelli; Pasqualina Mangiacapra; Giovanna G. Buonocore; Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films, *Carbohydrate Polymers*, Elsevier, Vol. 82, Núm. 2, septiembre 2010, pág. 291–298.
- [50] Siembra, aislamiento e identificación de microorganismos, *microbiología general* 2018, pág. 3.
- [51] Lozano-Navarro, J. I. et al., “Chitosan-starch films with natural extracts: Physical, chemical, morphological and thermal properties,” *Materials*, vol. 11, no. 1, pp. 1–20, 2018.
- [52] Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S. Meng, X. H., & Bourtoom, T., & Chinnan, M. S. (2008). Preparation and properties of rice starch – chitosan blend biodegradable film. *LWT – Food Sci Technol*, 41(9): 1633 – 1641.
- [53] Romero-Bastida, C.A., Bello-Pérez, L.A., Velázquez, G., Álvarez-Ramírez, “Antimicrobianos en Películas de Almidón Oxidado de Plátano: Efecto sobre la actividad antibacteriana, microestructura, propiedades mecánicas y de barrera,” pp. 445–453, 2011.
- [54] Sánchez Tatiana, García Omar, “Elaboración y caracterización de películas de almidón de yuca (*Manihot esculenta*) Variedad ICA,” 2012.

- [55] López, O. V., Castillo, L. A., Farenzena, S., Pintos, E., Rodríguez, M. S., García, M. A., Villar, M. A., “Película biodegradable de almidón de maíz termoplástico y quitosano con actividad antimicrobiana empleada como envase activo” 2018.
- [56] Bystrom, Laura M., Lewis, Betty A., Brown, Dan L., Rodríguez, Eloy, Obendorf, Ralph L. (2008). “Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits,” *Food Chemistry*, vol. 111, no. 4, pp. 1017–1024.
- [57] Bystrom, Laura M., Lewis, Betty A., Brown, Dan L., Rodríguez, Eloy, Obendorf, Ralph L. (2012) The potential health effects of *Melicoccus bijugatus* Jacq. fruits: Phytochemical, chemotaxonomic and ethnobotanical investigations.
- [58] Danis F. M, and G. O. Fernández, “Evaluación fitoquímica de las hojas de plantas con flores pistiladas de *Melicoccus bijugatus*,” 2016.
- [59] Torres-Delgado, C. L.; Díaz-Zavala, N. P.; Velasco-Santos C.; Salas, P. Martínez-Hernández, A. L.; Synthesis and Characterization of chitosan-starch films reinforced with TiO₂ nanoparticles, *Memorias del XIX International Material Research Congress*, Mexico, 2010.
- [60] Flores-Hernández, C.G; Colín-Cruz, A; Velasco-Santos, C; Castaño, V.M; Rivera-Armenta, J.L; Almendarez-Caramillo, A; García-Castillas, P.E; Martínez-Hernández, A.L., *All Green Composites from Fully Renewable Biopolymers: Chitosan-Starch Reinforced with Keratin from Feathers*, *Polymers*, Vol. 6, Num. 3, 2014, pág. 686-705.
- [61] NOM-092-SSA1-1994, Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en placa, *Diario Oficial de la Nación*, Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, México, 1995.
- [62] NOM-113-SSA1-1994, Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en placa, *Diario Oficial de la Nación*, Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, México, 1995.
- [63] NOM-111-SSA1-1994, Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en Alimentos, *Diario Oficial de la Nación*, Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, México, 1995.
- [64] Herrera, Marco Luis. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34 pág. 33-41. Retrieved May 04, 2019, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en&tlng=es.
- [65] I. Leceta; P. Guerrero; K. de la Caba; Functional properties of chitosan-based films, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 93, Núm. 1, 2013, pág. 339–346.

- [66] Kanatt, S. R.; Rao, M. S.; Chawla, S. P.; Sharma, A.; Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts, *Food Hydrocolloids*, Vol. 29, Núm. 2, 2012, pág. 290-297.
- [67] NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.,” Colpos.Mx, pp. 3–6, 1978.
- [68] Image Color Summarizer, RGB, HSV, LCH & Lab Image Color Statistics and Clustering—Simple and Easy. Available online: <http://mkweb.bcgsc.ca/color-summarizer/>
- [69] J. H. Han; J. D. Floros; Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity, *Journal of Plastic Film and Sheeting*, Vol. 13, Núm. 4, octubre 1997, pág. 287-298.
- [70] Gontard, N; Guilbert, S; Cuq, J.L; Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology, *Journal of Food Science*, Vol. 57, Num. 1, enero 1992, pág. 190-199.
- [71] K. K. Adom; R. H. Liu; Antioxidant Activity of Grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, Núm. 21, 2002, pág. 6183-6187.
- [72] Y. Y. Lim; L. Theng; T. Tee; J. J. Tee; Antioxidant Properties of Guava Fruit: Comparison with some local fruits, *Sunway Academic Journal*, Vol. 3, 2006, pág. 9–20.
- [73] Y. Y. Lim; T. T. Lim; J. J. Tee; Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study, *Food Chemistry*, Vol. 103, Núm. 3, 2007, pág. 1003–1008.
- [74] V. L. Singleton; J. A. Rossi Jr.; Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 16, 1965, pág. 144–158.
- [75] F. Pourmorad; S. J. Hosseinimehr; N. Shahabimajd; Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5, Núm. 11, 2006, pág. 1142-1145.
- [76] S. McDonald; P. D. Prenzler; M. Autolovich; K. Robards; Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts, *Food Chemistry*, Vol. 73, Núm. 1, 2001, pág. 73-84.
- [77] A. Lamien-Meda; C. E. Lamien; M. Romito, J. F. Millogo; O. G. Nacoulma; Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, Vol. 91, Núm. 3, 2005, pág. 571–577.
- [78] Wrolstad, R.E; Durst, R.W; Lee, J; Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, *Trends in food Science & Technology*, Vol. 16, Núm. 9, septiembre 2005, pág. 423-428.

- [79] Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
- [80] Pérez-Cordero, A. Rojas-Sierra J. Rodríguez-Ruíz J. Arrieta-Álvarez I., Arrieta-Álvarez Y. Rodríguez-Carrascal A. 2014. Actividad antibacteriana de soluciones acidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón.
- [81] Araya, A. and Meneses, L. “Influencia de Algunos Ácidos Orgánicos Sobre las Propiedades Físico-Químicas de Películas de Quitosano Obtenidas a Partir de Desechos de Cangrejo,” vol. 23, pp. 147–148, 2010.
- [82] Hernández-Solomando, R. M. Escola Tècnica Superior “Incorporación de polifenoles a films a base de biopolímeros: propiedades físicas y antioxidantes,” Thesis in food science and technology, polytechnic university of valencia, p. 26, 2015.
- [83] Liliana C. Tomé; Susana C. M. Fernandes; Patrizia Sadocco; Jessica Causio; Armando J. D. Silvestre; Carlos Pascoal Neto; Carmen S. R. Freire; Antibacterial thermoplastic starch-chitosan based materials prepared by melt-mixing, *Bioresources*, Vol. 7, Núm. 3, agosto 2012, pág. 3398-3409.
- [84] Eraricar Salleh; Ida Idayu Muhamad; Nozieanna Khairuddin; Structural Characterization and Physical Properties of Antimicrobial (AM) Starch Based Films, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, Vol. 3, Núm. 7, julio 2009, pág. 352-360.
- [85] Sindhu Mathew; M. Brahmakumar; T. Emilia Abraham; Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal and swelling properties of starch-chitosan blend films, *Biopolymers*, Vol. 82, Núm. 2, junio 2006, pág. 176-187.
- [86] Valero-Valdivieso, M. F. Ortégón, Y. and Uscategui, Y. “Avances biopolímeros,” pp. 171–180, 2013.
- [87] Tablas de espectrometría https://www.ugr.es/~quioired/lab/tablas_espec/h_tms.htm
- [88] Tutorial para interpretación de espectros de Resonancia Magnética Nuclear [https://www.academia.edu/7586795/tutorial_para_la_interpretaci% c3%93n_de_espectros_de_resonancia_magn% c3%89tica_nuclear_de_prot% C3%93N?auto=download](https://www.academia.edu/7586795/tutorial_para_la_interpretaci%c3%93n_de_espectros_de_resonancia_magn%c3%89tica_nuclear_de_prot%C3%93N?auto=download).
- [89] K. Fisher and C. A. Phillips, “The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 101, no. 6, pp. 1232–1240, 2006.

[90] Soler Cantero, A. “Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva”. Tesis Doctoral Noviembre, 2009.