



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Preparación y caracterización de películas a base de quitosano entrecruzado con ácido láctico, aplicado en la conservación de carne cruda**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A**

**ANA BELEN AGUILLON GOMEZ**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** EDUARDO MENDOZA MARTINEZ

**VOCAL:** ALEJANDRO RAFAEL ZAVALA RIVAPALACIO

**SECRETARIO:** CONCEPCION KEIKO SHIRAI MATSUMOTO

**1er. Suplente:** JOSE LUIS GODINEZ RODRIGUEZ

**2do. Suplente:** ELSI IDELI JUAREZ ARROYO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros (S-157) y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos (PP10) del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevo acabo con financiamiento CONACYT (SEP-Básica No.237292 y SE-FINNOVA No.224962).

ASESOR DEL TEMA:

SUSTENTANTE:

---

DRA. CONCEPCION KEIKO SHIRAI MATSUMOTO

---

ANA BELEN AGUILLON GOMEZ

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN .....	12
INTRODUCCIÓN .....	13
<b>CAPITULO I. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
1. ENVASES.....	15
1.1.1 1.2 Envases biodegradables.....	15
1.2.1 Biopolímeros.....	15
1.2.2 Ventajas y desventajas de los biopolímeros como envases de alimentos .....	17
2. PELÍCULAS BIODEGRADABLES.....	17
1.1.2 2.1 Propiedades funcionales.....	18
1.1.3 2.2. Aplicaciones.....	18
1.1.4.....	19
1.1.5 2.3 Componentes de las películas .....	20
2.3.1 Películas de Hidrocoloides .....	20
2.3.2 Películas de Proteínas.....	20
2.3.3 Películas de polisacáridos .....	21
2.3.4 Películas de lípidos.....	21
2.3.5 Películas de mezclas .....	21
1.1.6 2.4 ADITIVOS .....	21
2.4.1 Plastificantes .....	22
2.4.1.1 Glicerol .....	23
2.4.1.2 Polietilenglicol.....	23
2.4.1.3. Sorbitol .....	24
1.1.7 2.5 Antimicrobianos .....	25

2.5.1	Ácidos orgánicos .....	26
2.5.1.1	Ácido láctico .....	27
3.	QUITINA Y QUITOSANO .....	28
1.1.8	3.1 QUITINA .....	29
1.1.9	3.2 QUITOSANO .....	30
3.2.1	Propiedades fisicoquímicas .....	31
3.2.2	Propiedades antimicrobianas .....	32
3.2.3	Métodos de obtención .....	33
3.2.4	Formación de películas.....	33
3.2.5	Modificación del quitosano .....	34
3.2.5.1	Quitosano-ácido láctico .....	34
4.	CARNE.....	35
1.1.10	4.1 Calidad de la carne.....	36
1.1.11	4.2 MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE .....	37
4.2.1	<i>Salmonella typhimurium</i> . .....	39
4.2.1.1	Características .....	39
4.2.1.2.	Factores físicos y químicos de desarrollo .....	40
4.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
1.1.12	4.3 Envases para la conservación de la carne .....	42
4.3.1	Técnicas de conservación de carne fresca.....	42
4.3.2	Charola de espuma de poliestireno convencional .....	43
4.3.3	Sistemas al vacío .....	43
4.3.4	Atmósferas modificadas .....	43
4.3.5	Películas plásticas utilizadas para empaque .....	44
4.3.6	Gases para el empackado de carne.....	46
1.1.13	4.4 Mercado Nacional.....	47
	<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>50</b>
	ESTUDIOS REALIZADOS CON PELÍCULAS DE QUITOSANO .....	50
	TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN EN CARNE .....	51
	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>53</b>

<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>55</b>
OBJETIVOS PARTICULARES.....	55
<b>CAPITULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>56</b>
II.1 MATERIALES.....	56
II.2 ETAPA I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO .....	57
1.1.14 II.2.1 Caracterización de quitosano .....	57
II.2.1.1 Determinación del porcentaje de humedad, cenizas y proteína residual.....	57
II.2.1.2. Determinación del porcentaje de solubles en solución de ácido acético .....	58
II.2.1.3 Peso molecular .....	58
II. 2.1.4.Grado de acetilación.....	60
II.2.1.5 Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA).....	60
II.3 ETAPA II. FORMULACIÓN, PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS QLA, QLG, QLS Y QLP .....	60
1.1.15 II.3.1 Obtención de las soluciones formadoras de película.....	60
II.3.1.1 Películas de quitosano ácido láctico (QLA) .....	60
II.3.1.2 Películas de quitosano ácido láctico y glicerol (QLG) .....	61
II.3.1.3 Películas de quitosano ácido láctico y sorbitol (QLS) .....	61
II.3.1.4 Películas de quitosano ácido láctico y polietilenglicol (QLP) .....	61
1.1.16 II.3.2 Preparación de películas .....	61
1.1.17 II.3.3 Caracterización de las películas .....	62
II.3.3.1 Rendimientos.....	62
II.3.3.2 Porcentaje de incorporación .....	62
II.3.3.3 Espectroscopia de ATR-FTIR.....	62
II.3.3.4 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (1H-RMN) .....	62
II.3.3.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	63

II.3.3.6 Relación molar (RM) y porcentaje de fracción molar (%FM) .....	63
II.3.3.7 Acondicionamiento .....	63
II.3.3.8 Peso de las películas.....	63
II.3.3.9 Espesor .....	63
II.3.3.10 Color .....	64
II.3.3.11 Propiedades Ópticas (Transparencia y Opacidad) .....	64
II.3.3.12 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	65
II.3.3.13 Permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono (PO <sub>2</sub> y PCO <sub>2</sub> ).....	66
Donde P es la permeabilidad al CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> , T es la trasmisión al gas, Δp es la diferencia de presiones entre la presión de los frascos y la del desecador y b es el espesor de las películas.....	66
II.3.3.14 Determinación de propiedades mecánicas.....	66
II.3.3.14.1 Acondicionamiento de las películas .....	67
II.3.3.14.2 Medición del espesor .....	67
II.3.3.14.4 Fuerza de fractura en la punción.....	67
II.3.3.14.5 Modulo de Young .....	67
II.3.3.15 Actividad antimicrobiana.....	68
II.3.3.15.1 Acondicionamiento .....	68
II.3.3.15.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	68
II.4 ETAPA III. EVALUACIÓN DE PELÍCULAS COMO ENVASE Y EFECTO INHIBIDOR CONTRA <i>S. TYPHIMURIUM</i> Y <i>S. AUREUS</i> EN CARNE (MOLIDA) DE BOVINO.....	68
1.1.18 II.4.1 Preparación del inóculo de <i>S. typhimurium</i> y <i>S. aureus</i> .....	69
II.4.1.1 Inoculación de <i>S. typhimurium</i> y <i>S. aureus</i> a la carne molida .....	69
II.4.1.2 Envasado de la carne .....	69
1.1.19 II.4.2 Análisis de carne .....	70
II.4.2.1 Pérdida relativa de peso (RWL).....	70
II.4.2.2 Humedad .....	70
II.4.2.3 pH y acidez total titulable (ATT).....	71
II.4.2.4 Color .....	71
II.4.2.5 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	71

II.4.2.6 Análisis microbiológico .....	72
<b>CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>73</b>
III.1 ETAPA I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO.....	73
III.2 ETAPA II. FORMULACIÓN, PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS QLA, QLG, QLS Y QLP .....	75
1.1.20 III.2.1 Formulación de quitosano-ácido láctico.....	75
1.1.21 III.2.2 Caracterización de las películas .....	76
III.2.2.1 Determinación de rendimientos .....	78
III.2.2.2 Porcentaje de fracción molar (%FM) .....	79
III.2.2.3 Peso y espesor .....	80
III.2.2.4 Color de las películas .....	82
III.2.2.5 Propiedades ópticas: Transparencia y opacidad .....	84
III.2.2.6 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	86
III.2.2.7 Permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono (PO <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> ).....	89
III.2.2.8 Actividad antimicrobiana.....	90
III.2.2.9 Propiedades Mecánicas .....	92
III.2.2.9 Microscopía electrónica de barrido .....	96
III.3 ETAPA III. EVALUACIÓN DE PELÍCULAS COMO ENVASE Y EFECTO INHIBIDOR CONTRA <i>S. TYPHIMURIUM</i> Y <i>S. AUREUS EN CARNE</i> (MOLIDA) DE BOVINO.....	100
1.1.22 III.3.1 Pérdida de peso relativa (PWR) y Humedad .....	100
1.1.23 III.3.2 PH y Acidez total titulable (ATT%).....	103
1.1.24 III.3.3 Color .....	106
1.1.25 III.3.4 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	111
1.1.26 III.3.5 Análisis microbiológico .....	113
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>136</b>
1. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO .....	136
2. ANALISIS DE H-RMN DE LOS COPOLÍMEROS.....	136

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE VARIANZA (ANOVA) Y PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS .....	140
--	-----

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biopolímeros .....	16
Tabla 2. Aplicaciones de las películas comestibles .....	19
Tabla 3. Agentes antimicrobianos utilizados en películas .....	25
Tabla 4. Propiedades generales de quitina y quitosano .....	29
Tabla 5. Composición aproximada del músculo de mamífero adulto después del rigor mortis .....	35
Tabla 6. Principales factores implicados en la ecología microbiana de la carne ...	38
Tabla 7. Límites de crecimiento y sobrevivencia de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	40
Tabla 8. Requerimientos de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y requerimientos para la generación de enterotoxinas.....	41
Tabla 9. Caracterización del quitosano .....	73
Tabla 10. Bandas características de los grupos funcionales del espectro de quitosano.....	74
Tabla 11. Rendimiento de películas .....	78
Tabla 12. Porcentaje de fracción molar del copolímero quitosano- ácido láctico ..	80
Tabla 13. Parámetros de color .....	82
Tabla 14. Absorbancia, transparencia y opacidad de películas comestibles.....	85
Tabla 15. Valores de permeabilidad al O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> .....	89
Tabla 16. Propiedades mecánicas de fuerza de fractura en la Extensión .....	93
Tabla 17. Propiedades mecánicas de fuerza de fractura en punción.....	94
Tabla 18. Parámetros de color para carne sin inocular .....	106
Tabla 19. Parámetros de Color para carne inoculada con <i>Staphylococcus aureus</i> .....	107
Tabla 20. Parámetros de Color para carne inoculada con <i>Salmonella typhimurium</i>	108

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del glicerol .....	23
Figura 2. Estructura química del polietilenglicol .....	24
Figura 3. Estructura química del sorbitol. ....	24
Figura 4. Estructura química de isómeros de ácido láctico .....	28
Figura 5. Estructura química de la quitina. ....	30
Figura 6. Estructura química del quitosano. ....	31
Figura 7. Copolimerización entre quitosano y ácido láctico.....	34
Figura 8. Producción de carne de bovino en México.....	47
Figura 9. Principales productores de carne de bovino .....	48
Figura 10. Consumo per cápita de carne en México .....	49
Figura 11 Preferencia de consumo de tipo de carne y lugar de compra. ....	49
Figura 12. Metodología experimental .....	59
Figura 13 Diseño experimental de carne inoculadas con <i>S. typhimurium</i> y <i>S. aureus</i> recubierta con los materiales a 4°C y 78 % HR.....	70
Figura 14. Cuenta en placa de bacterias .....	72
Figura 15. Espectro ATR-FTIR de quitosano. ....	75
Figura 16. Peso de películas.....	80
Figura 17. Espesor de películas.....	81
Figura 18 Sistema CIELAB.....	84
Figura 19 Espectro de absorbancia de las películas.....	84
Figura.20 PVA de las películas. ....	86
Figura 21.Efecto de inhibición de los materiales a base de quitosano (A) <i>Staphylococcus aureus</i> , (B) <i>Salmonella typhimurium</i> .....	90
Figura 22. % de inhibición de los materiales a base de quitosano, (A) <i>Staphylococcus aureus</i> , (B) <i>Salmonella typhimurium</i> . ....	90
Figura 23. Perfil de fuerza en la fractura en la extensión .....	93
Figura 24. Perfil de fuerza en la fractura en la punción .....	95
Figura 25. Micrografías de la película QLA, donde A y B frente; C y D reverso ....	97
Figura 26. Micrografía de película QLA.....	98

Figura 27. Microscopias de la película QLP .....	99
Figura 28 Pérdida relativa de peso (PWR) de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con <i>S. aureus</i> , (B) y <i>S. typhimurium</i> (C) a 4 °C y 78% HR.....	101
Figura 29 Humedad (%) de la carne con las películas como envase.....	102
Figura 30. pH de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con <i>Sta. aureus</i> , (B) y <i>S. typhimurium</i> (C) a 4 °C y 78% HR.....	104
Figura 31 ATT (% ác. Láctico) de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con <i>S. aureus</i> , (B) y <i>S. typhimurium</i> (C) a 4 °C y 78% HR.....	105
Figura 32. Sistema CIELAB, para la carne .....	109
Figura 33. Relación entre mioglobina y color de la carne.....	110
Figura 34. Evolución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico .....	112
Figura 35. Cuenta total en placa de mesófilos aerobios (A) , <i>S. aureus</i> (B) y <i>S. tiphymerium</i> (C) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 78%HR e.	116
Figura 36. Espectro de H-RMN de quitosano a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.....	136
Figura 37. Espectro de RMN-H a 400MHz de quitosano en medio ácido .....	137
Figura 38. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400MHz de ácido láctico en D <sub>2</sub> O . .....	137
Figura 39. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400MHz de QLA en medio ácido. ....	138
Figura 40. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400MHz de QLG en medio ácido.....	138
Figura 41. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400MHz de QLS en medio ácido. ....	139
Figura 42. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400MHz de QLP en medio ácido. ....	139

## Abreviaturas

<b>ATT</b>	Acidez Total Titulable
<b>ATR</b>	Espectroscopia de absorción en el infrarrojo con Transformada de Forier con Refractancia Total Atenuada (ATR-FTIR)
<b>CA</b>	Control sin inocular
<b>CB</b>	Control positivo a <i>S. aureus</i>
<b>CC</b>	Control positivo a <i>S. typhimurium</i>
<b>DA</b>	Grado de Acetilación
<b>FM</b>	Fracción molar
<b>HR</b>	Humedad Relativa
<b>PG</b>	Permeabilidad a gases
<b>PO<sub>2</sub></b>	Permeabilidad al oxígeno
<b>PCO<sub>2</sub></b>	Permeabilidad al dióxido de carbono
<b>PVA</b>	Permeabilidad al Vapor de Agua
<b>PVC</b>	Cloruro de polivinilo
<b>QLA</b>	Película de quitosano- ácido láctico
<b>QLG</b>	Película de quitosano- ácido láctico- glicerol
<b>QLP</b>	Película de quitosano ácido láctico-polietilenglicol
<b>QLS</b>	Película de quitosano-ácido láctico- sorbitol
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RWL</b>	Pérdida relativa de peso
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica deBarrido
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonia

## Resumen

Se evaluó el efecto de películas de quitosano entrecruzado con ácido láctico como envase primario en carne molida de bovino para su conservación. El trabajo experimental se dividió en tres etapas, i) obtención y caracterización de quitosano, ii) elaboración de películas a base de quitosano entrecruzadas con ácido láctico y diferentes plastificantes (glicerol, polietilenglicol y sorbitol), y por último iii) evaluación de las películas como envase que presentaron mejores características antimicrobianas y permeabilidad al vapor de agua (quitosano- láctico y quitosano- láctico/ polietilenglicol) en carne molida.

Las películas y la aplicación en carne molida se caracterizaron fisicoquímica y microbiológicamente. El empleo de películas de quitosano-ácido láctico y plastificante resultó una buena alternativa para proteger la carne molida de la oxidación de lípidos y proliferación de microorganismos, además la utilización de estos materiales a base de polímeros naturales resultó una forma innovadora para empacar y conservar la carne reduciendo, así el uso de envases no degradables.

## Introducción

El envasado de los alimentos ha permitido la conservación y prolongación de la vida útil. Sin embargo, el uso indiscriminado de materiales de envasado derivados del petróleo (plásticos), se ha convertido en un problema de contaminación ambiental, debido a su baja degradabilidad.

A manera de respuesta, se han hecho intentos para resolver este problema mediante la biodegradabilidad parcial de los materiales de origen petroquímico de uso cotidiano a través de modificaciones que incluyen la mezcla con polímeros de origen natural. Hoy en día, materiales tales como los biopolímeros o fibras naturales han atraído un gran interés debido a su biodegradabilidad, bioactividad y que son materiales renovables

Entre las aplicaciones buscadas, se encuentra el empleo de biopolímeros en la elaboración de envases activos con aplicación en la industria alimentaria. La finalidad del empleo de estos materiales es el extender la vida de anaquel de diversos alimentos, entre ellos productos lácteos, cárnicos y hortofrutícolas. Se ha logrado mantener las características de calidad que demanda el consumidor mediante el control de sus propiedades mecánicas, antimicrobianas y antioxidantes.

Los productos cárnicos son considerados alimentos altamente perecederos debido a sus características físicas, químicas y biológicas. Por tanto si no se aplican métodos de conservación adecuados no será posible garantizar al consumidor un producto inocuo y mantener su calidad.

Debido a esta problemática en productos cárnicos y otros alimentos, se ha estudiado la aplicación de películas, lo cual demuestra la eficiencia de las nuevas

tecnologías de conservación y se transforma en una herramienta para analizar la aplicabilidad que tienen algunos materiales.

La utilización de quitosano debido a que es un biopolímero, biodegradable y antimicrobiano, el cual forma películas capaces de emplearse como envase de alimentos, con la ventaja de obtenerse de una fuente natural considerada un desecho de la industria camaronera. Aunque las películas de quitosano poseen cualidades superiores con respecto a los plásticos, cuentan con la desventaja de ser rígidas y muy permeables al vapor de agua. Por estas razones se han llevado a cabo modificaciones químicas al quitosano, con la finalidad de obtener películas con características específicas y mejoradas.

Por lo que en el presente trabajo se prepararon materiales a base de quitosano, ácido láctico y plastificante que fueron evaluados como envase primario en carne molida de res.

## **Capítulo I. Marco teórico**

### **1. ENVASES**

De acuerdo con la **NOM-051-SCFI/SSA1-2010 4/27** el envase es cualquier recipiente, o envoltura en el cual está contenido el producto preenvasado para su venta al consumidor.

Han (2000); Marsh (2007); Hong (2008) están de acuerdo en que el envasado de alimentos tradicional se entiende como apoyo mecánico de alimentos protegiéndolos de influencias externas y daño. Esta función principal del envasado implica: minimizar la pérdida; el retardo del deterioro; la extensión de la vida útil; el mantenimiento de la calidad, la seguridad e inocuidad del alimento envasado.

En la actualidad debido al crecimiento de la producción sustentable se busca que los materiales con los que se fabrican los envases tengan el menor impacto posible en el ambiente. Como respuesta a esta necesidad surgieron los materiales biodegradables, una alternativa válida a la utilización de los plásticos tradicionales que se obtienen a partir de petróleo y que algunos requieren un tiempo aproximado de 200 años para ser degradados (parzanese, 2014).

### **1.2 Envases biodegradables**

#### **1.2.1 Biopolímeros**

Un polímero es una macromolécula constituida por la unión repetida de muchas unidades moleculares pequeñas, denominadas unidades de repetición, unidas entre sí por enlaces covalentes. En los polímeros sintéticos, estas unidades son formados por reacciones de polimerización a partir de monómeros (Sperling 2006), como puede ser el estireno o cloruro de vinilo, entre muchos otros. En los polímeros naturales, o biopolímeros, estos ya existen en la naturaleza como tal procedentes de rutas metabólicas, por ejemplo, celulosa, almidón y quitina.

Se conocen como biopolímeros o bioplásticos a aquellos materiales que cuando son expuestos a condiciones determinadas de humedad, oxígeno y microorganismos durante cierto tiempo, son transformados en sustancias sencillas (agua, CO<sub>2</sub>) y biomasa mediante la acción enzimática de los microorganismos (bacterias, hongos y otros) presentes en el ambiente. Las unidades estructurales de los plásticos de este tipo, se obtienen principalmente de materias primas renovables de origen animal, vegetal o microbiano (tabla 1).

**Tabla 1.** Biopolímeros

<p><b>Poliésteres</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polihidroxicanoatos</li> <li>• Ácido poli-láctico</li> </ul>	<p><b>Polisacáridos (Plantas/algas)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Almidón (amilosa/amilopectina)</li> <li>• Celulosa</li> <li>• Agar</li> <li>• Alginato</li> <li>• Carragenina</li> <li>• Pectina</li> <li>• Konjac (glucomanano)</li> <li>• Gomas</li> </ul>
<p><b>Proteínas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sedas</li> <li>• Colágeno/gelatina</li> <li>• Elastina</li> <li>• Resilina</li> <li>• Adhesivos</li> <li>• Poliamino ácidos</li> <li>• Soya, zeína, gluten, caseína, seroalbúmina</li> </ul>	<p><b>Polisacáridos (Animal)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quitina/quitosano</li> <li>• Ácido hialurónico</li> </ul>
<p><b>Polisacáridos (origen bacteriano)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Xantana</li> <li>• Dextrano</li> <li>• Lavano</li> <li>• Poligalactosamina</li> <li>• Celulosa</li> </ul>	<p><b>Lípidos/Surfactantes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetoglicéridos, ceras, surfactantes</li> </ul>
<p><b>Polisacáridos (origen fúngico)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polulano</li> <li>• Glucanos (levadura)</li> </ul>	<p><b>Polifenoles</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lignina</li> <li>• Taninos</li> </ul>
	<p><b>Polímeros especiales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Goma laca</li> <li>• Ácido poli-gama glutámico</li> <li>• Caucho natural</li> <li>• Polímeros sintéticos obtenidos de grasas y aceites</li> </ul>

### 1.2.2 Ventajas y desventajas de los biopolímeros como envases de alimentos

Los biopolímeros presentan ventajas y desventajas en relación a polímeros sintéticos. A continuación se encuentran algunas de ellas:

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"><li>• Biodegradables.</li><li>• De tecnología simple</li><li>• Mejora las características sensoriales del producto empacado como: olor, apariencia, sabor.</li><li>• Puede incorporar antioxidantes y agentes antimicrobianos.</li><li>• Reduce el volumen y residuos de empaque. (Elizondo &amp; Gallo, 2011).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bajas barreras de gas y humedad.</li><li>• Propiedades mecánicas pobres.</li><li>• Además es necesario mejorar rendimientos de obtención y optimización de los procesos de producción de biopolímeros. (Enríquez et al., 2012).</li></ul>

## 2. PELÍCULAS BIODEGRADABLES

Una película biodegradable, según Guilbert (2000) y Krochta (2005), es una capa delgada y continua, hecha de materiales que pueden ser ingeridos por los seres vivos y que proveen una barrera a la humedad, oxígeno y solutos; además pueden servir como agentes acarreadores de otros ingredientes o aditivos (antioxidantes, saborizantes, antimicrobianos y colorantes). El material puede cubrir completamente el alimento o puede colocarse entre los componentes del mismo.

Entre las propiedades físicas más importantes para las películas y cubiertas comestibles se encuentran:

- Color
- Opacidad aparente
- Transparencia

- Permeabilidad al vapor de agua
- Permeabilidad de gases
- Otras relacionadas con la resistencia mecánica como elongación y punto de quiebre.

## **2.1 Propiedades funcionales**

Las películas comestibles no son diseñadas con la finalidad de reemplazar los materiales de empaques sintéticos si no para mejorar la calidad del alimento en general, extender el tiempo de vida de anaquel y mejorar la eficiencia económica de los materiales para empaque. Las propiedades funcionales que ofrecen las películas dependen de los componentes de los que estén elaboradas. Algunas de las propiedades funcionales que desempeñan al ser aplicadas en alimentos son: (Fennema, 1995; Soliva y Martin, 2001; Tharanathan, 2003; Yu, 2004):

- Reducir la pérdida de humedad.
- Reducir el transporte de gases (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>).
- Reducir la migración de aceites y grasas.
- Reducir el transporte de solutos.
- Mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los alimentos.
- Proveer integridad estructural a los alimentos.
- Retener los componentes volátiles.
- Contener aditivos.

## **2.2. Aplicaciones**

Actualmente el uso de películas se ha extendido a muchos alimentos: productos cárnicos, pescados y aves tanto frescos como congelados, frutas y hortalizas enteras o en trozos, quesos, platos preparados entre otros (Moller *et al.*, 2004). Esto se debe al desarrollo de formulaciones innovadoras respecto a los biopolímeros utilizados para su composición. Según el tipo de biopolímeros

(proteínas, polisacáridos o lípidos) que componga la película sus características y funciones serán diferentes, ya que están ligadas a la composición química y estructural del mencionado biopolímero. Dichas funciones están asociadas a la preservación de la calidad de los alimentos sobre los cuales se aplica y consisten principalmente en servir como barrera en la transferencia de distintas sustancias, desde el alimento hacia el exterior y viceversa (Parzanese, 2014)

Una funcionalidad importante de las películas es su habilidad para incorporar ingredientes activos, ya que pueden servir como soporte de aditivos capaces de conservar y mejorar la calidad del producto (Escobar *et al.*, 2009). En la Tabla 2 se presentan diversas aplicaciones de las películas comestibles en alimentos.

**Tabla 2.** Aplicaciones de las películas comestibles

<b>PROPÓSITO</b>	<b>APLICACIONES</b>
Proveer protección individual contra la humedad y el oxígeno	Pescado, carne, queso frescos y derivados, botanas
Retardar el crecimiento microbiano externo	Alimentos de humedad intermedia
Mejorar las propiedades mecánicas	Pizzas, pays, sándwiches, pasteles
Proveer integridad estructural para reforzar la estructura del alimento	Cacahuates, camarones, botanas
Restringir la migración de humedad	Pescado, alimentos liofilizados
Proteger las piezas que estarán dentro de tazas o bolsas	Frutas, horneados, helados
Proteger las superficies o el empaçado de la absorción de grasa	Queso, fruta seca, botanas
Mejorar la apariencia del alimento añadiéndole brillo	Productos de panificación, fruta seca, botanas
Mejorar sabor, color	Alimentos diversos

adaptado de Guilbert, 1995

## **2.3 Componentes de las películas**

Krochta et al. (2005) clasifican a los componentes de las películas biodegradables en tres categorías:

- a) Hidrocoloides: proteínas, derivados de celulosa, alginatos, pectinas, almidones, entre otros.
- b) Lípidos: ceras, acilgliceroles y ácidos grasos
- c) Mezclas que contienen lípidos e hidrocoloides.

Estos mismos mencionan que las propiedades de cada película dependen del tipo de componente.

### **2.3.1 Películas de Hidrocoloides**

Este tipo de películas poseen excelentes propiedades mecánicas así como de barrera frente al oxígeno, dióxido de carbono y lípidos. La mayoría de estas películas tienen propiedades mecánicas deseables para trabajar con productos frágiles, son sensibles al calentamiento y no aportan sabor. Los hidrocoloides usados para películas pueden ser clasificados conforme su carga molecular, composición molecular y solubilidad (Yu, 2004).

### **2.3.2 Películas de Proteínas**

Las películas de proteína se adhieren fácilmente a superficies hidrofílicas pero en la mayoría de los casos no son resistentes a la difusión del agua. Las fuentes más comunes son: zeína, soya, albúmina de huevo, lactoalbúmina, suero de leche, gluten, y colágeno. Son susceptibles al cambio de pH por lo que deben delimitarse a las condiciones óptimas de su formación.

### **2.3.3 Películas de polisacáridos**

Las películas de polisacáridos tienen buenas propiedades de barrera a los gases y pueden adherirse a superficies de frutas y vegetales. Una desventaja de este tipo de películas es que las propiedades de barrera a la humedad son muy bajas debido a la naturaleza hidrofílica de las mismas (Guilbert, 1995). Se han elaborado películas a partir de celulosa, pectina, almidón, alginatos, quitosano, carrageninas y mezclas. Estas películas la mayoría de las veces son fuertes, de color claro, resistentes relativamente al paso del agua, no se ven afectadas por aceites, grasas o disolventes orgánicos no polares (Yu, 2004).

### **2.3.4 Películas de lípidos**

Se ha utilizado una variedad de componentes lipídicos como cubiertas protectoras, incluyendo las ceras naturales y surfactantes. Debido a la baja polaridad de estas películas, la función principal es la de barrera contra el paso de humedad o como agentes de recubrimiento para darle brillo a productos de confitería o frutas, pero sus desventajas son que la superficie se puede tornar grasosa o que ocurra una rancidez, afectando directamente la calidad sensorial (Yu, 2004). Las ceras y los lípidos, incluyendo la lecitina, cera de abeja y glicéridos, son sumamente usados para el recubrimiento de frutas, pero antes de ser consideradas como películas se consideran como simples cubiertas (Guzmán, 2003).

### **2.3.5 Películas de mezclas**

Se pueden hacer mezclas de polisacáridos, proteínas y/o lípidos, con lo que se pueden combinar las ventajas de lípidos e hidrocoloides y disminuir sus desventajas, sus principales aplicaciones son en frutas y vegetales procesados (Guzmán, 2003).

## **2.4 ADITIVOS**

Varios materiales pueden ser incorporados dentro de las películas comestibles para impartir propiedades mecánicas, nutricionales, protectoras y sensoriales a las

películas, como son: agentes antimicrobianos, ácidos orgánicos, antioxidantes, colorantes, saborizantes y otros aditivos nutricionales (Pérez,2012).

Los aditivos pueden ser:

- a) Plastificantes (ceras, aceites, ácidos grasos).
- b) Conservadores químicos (ácido benzoico, ácido sórbico).
- c) Surfactantes y emulsionantes (grasas, aceites).

La influencia que tendrá el aditivo en las propiedades de la película dependerá del grado de concentración, de la estructura química, del grado de dispersión en la película y de la interacción con los polímeros (Yu, 2004).

#### **2.4.1 Plastificantes**

Los plastificantes son un factor muy importante en la formulación de películas comestibles ya que afectan sus propiedades mecánicas y su permeabilidad. Éstos reducen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas de polímero e incrementan el volumen libre, en consecuencia, existe más espacio para que las moléculas de agua migren, produciendo un decremento en la fuerza de cohesión y en la tensión. El plastificante debe ser miscible con el polímero (Bertuzzi, 2002).

Los plastificantes comúnmente usados en la industria de alimentos son:

- a) Monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos (glucosa, jarabes de fructosa, miel).
- b) Polioles (sorbitol, glicerol, polietilenglicoles y los derivados del glicerol).
- c) Lípidos y derivados (ácidos grasos, monoacilgliceroles, derivados éster,
- d) fosfolípidos y surfactantes) (Guzmán, 2003)

Cabe señalar que el incremento en la flexibilidad de las películas se acompaña por un incremento de permeabilidad de las mismas, que depende del tipo y de la cantidad de plastificante. Este incremento en la permeabilidad no es deseado para la calidad de los alimentos, por lo cual es necesario optimizar el uso de

plastificante para ofrecer el balance correcto de propiedades mecánicas y de barrera para la aplicación deseada (Olabarrieta, 2005).

#### 2.4.1.1 Glicerol

Los plastificantes hidrofílicos como el glicerol son compatibles con el material polimérico que forma la película y aumenta la capacidad de absorción de moléculas polares tales como el agua (Bertuzzi, 2002). El glicerol es soluble en agua, es polar, no es volátil, no es dañino para películas en contacto con alimentos, estas propiedades hacen que el glicerol sea un plastificante adecuado para usar con un polímero soluble al agua compatible (Olabarrieta, 2005). El glicerol es el poliol (figura 1), que es parte constitutiva de las grasas y los aceites; por tener tres átomos de carbono se le clasifica como triol (Badui, 2006), su estado de agregación es líquido, de apariencia incolora, densidad  $1.261 \text{ g/cm}^3$  y punto de ebullición  $290 \text{ }^\circ\text{C}$  (Monreal, 1988).

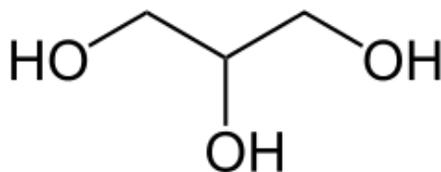


Figura 1. Estructura química del glicerol

#### 2.4.1.2 Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) también es conocido como polioxietileno (PEO por sus siglas en inglés) es un poliéter sintético soluble en agua y en varios solventes orgánicos. A bajos pesos moleculares ( $P_m < 1000 \text{ g/mol}$ ) es un líquido viscoso e incoloro, mientras que a valores mayores es una cera sólida y blanca con punto de fusión proporcional al peso molecular (con un límite superior cercano a los  $67 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Industrialmente para productos con un peso molecular menor a  $100.000 \text{ g/mol}$  se usa el término PEG, mientras que para valores superiores se les conoce como PEOs. (Sigma-Aldrich Co. LLC, 2012).

No es un producto tóxico, por lo que se utiliza en aplicaciones de empaque de alimentos, cosméticos, empaque de medicinas, entre otros. En la figura 2 se muestra la estructura del polímero.

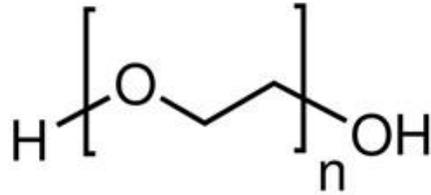


Figura 2. Estructura química del polietilenglicol

#### 2.4.1.3. Sorbitol

Es un azúcar natural altamente empleado en la industria. Químicamente es un poliol que cuenta con seis carbonos y seis grupos hidroxilo (figura 3). El sorbitol es un azúcar cristalino con un poder endulzante 50% menor que la sacarosa (Rosero, 2011).

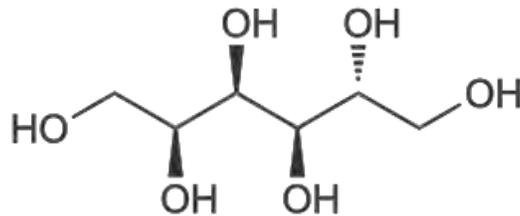


Figura 3. Estructura química del sorbitol.

La adición de sorbitol a una película comestible aumenta su porcentaje de elongación. Pero por lo contrario a la adición del glicerol es directamente proporcional a su capacidad de extensión (Brandao, 2012).

Un plastificante es un factor muy importante en la formulación de las películas comestibles ya que afectan las propiedades mecánicas y la permeabilidad de las películas. Los plastificantes alteran la estructura de las películas, la movilidad de la cadena y los coeficientes de difusión de gases o agua. Los plastificantes son compuestos de baja volatilidad que pueden ser añadidos para impartir flexibilidad a una película polimérica (Yu, 2004).

## 2.5 Antimicrobianos

La calidad y la seguridad son objetivos primordiales de la industria de los alimentos. Debido a la preferencia de los consumidores por alimentos frescos y mínimamente procesados (Pranoto *et al.*, 2005), se han planteado nuevos desafíos. En particular, el control de las enfermedades causadas por microorganismos (hongos, bacterias y levaduras) ha originado la búsqueda de nuevos compuestos que eviten la contaminación de los alimentos durante la manipulación y el almacenamiento (Badawy *et al.*, 2009).

Las películas comestibles tienen la capacidad de incorporar agentes antimicrobianos para proveer estabilidad microbiológica a los alimentos; ya que sirven como acarreadores de un amplio número de compuestos, los cuales incluyen enzimas, agentes quelantes, bacteriocinas, benzoatos, propionatos, entre otros (Tabla 3). Estos compuestos tienen la capacidad de extender la vida de anaquel de un producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos (Cagri *et al.*, 2001; Krochta, 2005; Ozdemir y Flores, 2008).

**Tabla 3.** Agentes antimicrobianos utilizados en películas

Benzoatos	Sal	Pediocina
Sorbatos	Ácido láctico	Aceites esenciales
Parabenos	Ácido acético	Lactoferrina
Propionatos	Nitritos	
Ácidos grasos	Nisina	

Cagri *et al.* 2001

Cuando se elaboran películas comestibles que contienen sustancias antimicrobianas, se espera que tengan la capacidad de migrar hacia la superficie del alimento o permanecer retenidas en la película, ambos fenómenos determinan la efectividad antimicrobiana de una película. La migración dependerá de las interacciones electrostáticas entre el agente antimicrobiano y las cadenas del polímero, los fenómenos de ósmosis iónica, los posibles cambios estructurales inducidos por la presencia del agente antimicrobiano y las condiciones

ambientales a las que se exponen las películas elaborados (Cha y Chinnan, 2004; Sebti *et al.*, 2007).

La difusión de los antimicrobianos en una película comestible está influenciada por el tipo de polímero, plastificante y proceso de elaboración; las características del alimento a recubrir, como pH y actividad de agua; las propiedades hidrofílicas de la película, las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento (Lin y Zhao, 2007; Ozdemir y Flores, 2008).

Entre las sustancias que se han utilizado como agentes antimicrobianos son los ácidos orgánicos, esto debido a la acidificación del medio, ya que pueden limitar la proliferación de bacterias.

### **2.5.1 Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos se concentran habitualmente en la naturaleza. Son compuestos orgánicos que poseen al menos un grupo carboxílico. Se distinguen el ácido cítrico, fórmico, acético, málico, tartárico, salicílico, oxálico, láctico y los grasos. Muchos de ellos constituyen metabolitos intermediarios y productos finales del metabolismo microbiano y se encuentran en muchos productos lácticos, cárnicos y vegetales fermentados (Suppakul *et al.*, 2003). Nuestros antepasados descubrieron que los cambios deseables desarrollados sobre el aroma y la textura de estos productos y la acidez causada por la formación de ácidos orgánicos constituía un medio valioso para retrasar la alteración proteolítica e inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables. Esto permitió conservar gran cantidad de alimentos perecederos y hacer la dieta más variada.

La actividad antimicrobiana de un ácido orgánico o su éster se debe a las moléculas no disociadas del compuesto. Algunos ácidos orgánicos en su estado no disociado son muy solubles en las membranas celulares. Según una hipótesis, estos compuestos inhiben el crecimiento de los microorganismos, o los matan, por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del

sistema transportador de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos. El pKa (pKa igual al pH en el cual el 50 % del ácido se encuentra no disociado) de los ácidos orgánicos empleados como conservadores están en un intervalo de pH de 3-5. Al bajar el pH de un alimento, aumenta la proporción de las moléculas no disociadas de un determinado ácido orgánico, aumentando de esta forma su efectividad como agente antimicrobiano.

La eficacia de un ácido orgánico en un alimento está afectada de una forma especial por la actividad de agua, el pH, el potencial redox, la disponibilidad de sustrato y el contenido graso. De igual importancia para la selección de un determinado ácido orgánico es la microbiota que se pretende inhibir o destruir, y tiene importancia el número de microorganismos, el tipo, la resistencia relativa del microorganismo normalmente presente, así como su habilidad para crecer en las condiciones normales de uso y almacenamiento. Por lo tanto, la elección de un determinado ácido orgánico depende, no sólo de las características inherentes al mismo (por ejemplo, actividad antimicrobiana adecuada, solubilidad, estabilidad y compatibilidad con las propiedades sensoriales) sino también de las condiciones microambientales y de almacenamiento del alimento (Suppakul *et al.*, 2003).

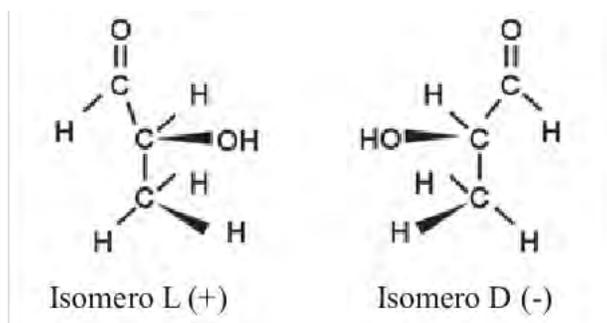
#### **2.5.1.1 Ácido láctico**

El ácido láctico, o su forma ionizada, el lactato (del lat. lac, lactis, leche), también conocido por su nomenclatura oficial ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido  $\alpha$ -hidroxi-propanoico. Es un líquido, incoloro, fuertemente higroscópico, soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter del petróleo y disulfuro de carbono (Bello-Gil, 2007). En soluciones acuosas, el ácido láctico no ionizado existe en equilibrio con los aniones lactato y los iones hidrógeno (Kulprathipanja y Oroskar, 1991). Sus dos grupos funcionales (-OH, -COOH) permiten llevar a cabo diferentes reacciones químicas de oxidación, reducción, condensación y sustitución del grupo alcohol (Vaidya *et al.*, 2005). En cuanto a los altos

rendimientos de producto, son debido a las reacciones de condensación, las más importantes, esterificación, deshidratación y aminólisis (Kirk-Othmer, 2001).

El ácido láctico se hidroliza a dióxido de carbono y agua tiene dos formas ópticamente activas (dextro y levo) y la forma racémica, ópticamente inactiva (D, L) que es la comercial (Menéndez, 1999) figura 4.

El ácido láctico es ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, médica, farmacéutica y cosmética, como materia prima para síntesis orgánica, como purgante en forma de lactato de calcio o lactato de magnesio, como removedor de sales de calcio, en el curtido de pieles, en la producción de plásticos biodegradables, agroquímicos, entre otro (Horán *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Estructura química de isómeros de ácido láctico

### 3. QUITINA Y QUITOSANO

Los biopolímeros quitina y quitosano son aminopolisacáridos naturales con estructuras únicas, propiedades multidimensionales, lo que les confiere un amplio rango de aplicaciones en biomedicina, alimentos y otras áreas de la industria, debido a sus atributos como biocompatibilidad, biodegradabilidad con seguridad ecológica, baja toxicidad, actividad antimicrobiana y baja inmunogenicidad, así mismo inmensas posibilidades estructurales para la modificación química y mecánica generando novedosos materiales con diversas propiedades, funciones y aplicaciones (Pillai *et al.*, 2009).

El peso molecular (*MW*) y el grado de acetilación (*DA*), son parámetros que afectan las propiedades de la quitina y el quitosano en solución. La tabla 4 muestra intervalos de *MW*, *DA*, viscosidad y principales disolventes de la quitina y el quitosano (Pacheco, 2010).

**Tabla 4.** Propiedades generales de quitina y quitosano

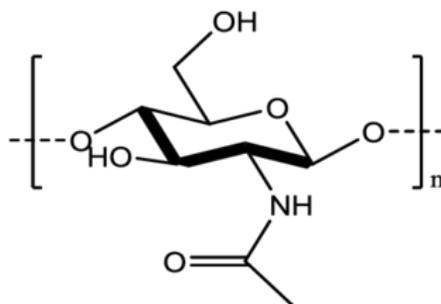
Propiedad	Quitina	Quitosano
<i>MW</i>	1x10 <sup>6</sup> a 2.5x10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> a 5x10 <sup>3</sup>
<i>DA</i>	>40	0 a 40
Viscosidad (cps) 1% disuelto en 1% de ácido acético	No soluble	200-2000
Humedad (% p/p)	8-10	6-7
Solubilidad	DMac-LiCl/TCA-MC	Soluciones Ácidas

Pacheco, 2010

### 3.1 QUITINA

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza después de la celulosa, es uno de los componentes estructurales mayoritarios del exoesqueleto de insectos, crustáceos, artrópodos, anélidos, moluscos, celenterados y es un componente de la pared celular de algunos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, así como de algas como las diatomeas (Shahidi *et al.*, 1999; Martínez, 2009).

Está constituida por residuos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) ó 2-acetamido-2 desoxi-beta-D-glucosa figura 5. (Shahidi *et al.*, 1999) enlazadas por unión β- 1-4. La quitina, es un polisacárido cristalino de tonalidad blanca-amarrillenta, rígido y no elástico, cuenta con tres diferentes formas cristalográficas: α-, β- y γ-quitinas.



**Figura 5.** Estructura química de la quitina.

El método utilizado a nivel industrial para la obtención de quitina consiste en un proceso químico, el cual hidroliza la proteína y remueve la materia inorgánica. Esta técnica emplea grandes cantidades de agua, energía, ácidos y álcalis en altas concentraciones lo que dificulta la recuperación de productos de alto valor agregado como proteínas y pigmentos. Para la extracción de quitina, el uso de métodos biotecnológicos como la fermentación ácido láctica (FAL) permite recuperar productos de alto valor agregado (Gimeno et al. 2007). Después de realizar la FAL, la concentración y la cantidad de ácidos y álcalis empleados para la purificación de la quitina disminuyen significativamente (Shirai et al. 2001; Cira et al. 2002).

### 3.2 QUITOSANO

El quitosano es mucho menos abundante en la naturaleza que la quitina, pudiéndose encontrar sólo en la pared celular de ciertos hongos y algunas plantas (Shirai *et al.*, 1996). Este polímero es biodegradable, biocompatible, no posee toxicidad (Kanatt *et al.*, 2008) y tiene un carácter antimicrobiano (Rabea *et al.*, 2003), además es un biomaterial muy versátil que puede emplearse en forma de solución, película, fibra, hidrogel, o nanopartícula; debido a éstas características se han incrementado sus aplicaciones en diversas áreas tales como: agricultura, industria alimenticia, medicina, farmacéutica, cosméticos, tratamiento de aguas, papel y textiles.

El quitosano es el derivado *N*-desacetilado de la quitina, contiene más de 5000 unidades de glucosamina (2-amido-2-desoxi-beta-D-glucosa) (Shahidi *et al.*, 1999), unidos mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1-4 (Figura 6).

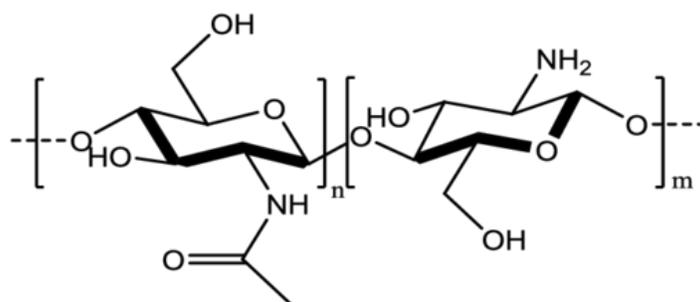


Figura 6. Estructura química del quitosano.

Tiene tres grupos funcionales reactivos, un grupo amino y dos grupos hidroxilo en C-3 y C-6; la modificación química de éstos así como la regeneración de la reacción, incrementa la biofuncionalidad de los productos de la molécula, ya sea la conformación original o nuevas estructuras (Hirano, 1999).

### 3.2.1 Propiedades fisicoquímicas

El quitosano es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos al igual que en soluciones alcohólicas ácidas, cuando el pH se encuentra por debajo de 6. Es insoluble en agua, soluciones alcalinas y disolventes orgánicos puros. Es muy estable y poco sensible a la humedad, se descompone a temperaturas mayores de 185°C (Muzzarelli *et al.*, 1990).

Es una sustancia biodegradable, no tóxica, biocompatible con células y tejidos animales, puede ser química o enzimáticamente modificado y gracias a los grupos aminos que posee presenta actividad antimicrobiana (Rabea *et al.*, 2003). Las características y propiedades del quitosano como: pureza, grado de desacetilación, peso molecular, viscosidad y estructura polimórfica varían de acuerdo a su proceso de manufactura (Goosen, 1997).

### 3.2.2 Propiedades antimicrobianas

El quitosano se ha utilizado de manera satisfactoria sobre diversos microorganismos, entre ellos hongos como son: *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichophyton equinum*, algas y algunas bacterias Gram negativas y positivas. Destaca la inhibición de bacterias como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, y *Staphylococcus aureus*. La acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como: tipo de quitosano, peso molecular, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales, el hospedero, la composición química y nutritiva del sustrato, grado de despolimerización y la presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y proteínas (Rabea *et al*, 2003).

El mecanismo de acción por el cual el quitosano actúa como agente antimicrobiano no se encuentra totalmente dilucidado, pero existen diferentes teorías como:

- La interacción entre la carga positiva del grupo amino protonado y las cargas negativas de la membrana celular, alterando las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo; bloqueando físicamente la membrana celular externa, impidiendo el flujo normal de nutrientes y desechos, provocando la muerte bacteriana (Shahidi *et al.*, 1999; Lárez, 2008).
- Actúa como agente quelante y se une selectivamente con metales traza de importancia biológica, lo cual inhibe el crecimiento del microorganismo (Rabea *et al.*, 2003).
- Activa distintos mecanismos de defensa en el tejido del hospedero (Rabea *et al.*, 2003).
- Agente enlazante de agua, inhibiendo diferentes enzimas (Rabea *et al.*, 2003).
- Penetra al interior de la célula bacteriana e interacciona con el ADN, lo cual inhibe la síntesis de ARN y proteínas (Plascencia, 2004).

### **3.2.3 Métodos de obtención**

El quitosano al ser un derivado de la quitina se obtiene a partir de la desacetilación de ésta; la cual se lleva a cabo en medio alcalino a concentraciones elevadas de 40-60% (KOH, NaOH) y a diferentes temperaturas (Lamarque *et al.*, 2005).

Existen dos tipos de desacetilación química: la desacetilación homogénea y la heterogénea, la primera se lleva a cabo a bajas temperaturas o a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, con lo que se asegura la uniformidad de la reacción (Nemtsev *et al.*, 2002; Pacheco, 2010) y la distribución de los grupos acetil resultante es arbitraria.

La desacetilación heterogénea es aquella en la que se utilizan altas temperaturas (100 a 140° C) las cuales favorecen la velocidad de la reacción, sin embargo la desacetilación se da con mayor rapidez en las regiones amorfas del biopolímero que en las áreas cristalinas lo que proporcionan una distribución de bloque e impide una mayor desacetilación. La presencia de oxígeno durante la desacetilación favorece la degradación del polisacárido y da como resultado una disminución en la viscosidad y el peso molecular de los productos, estos cambios pueden ser limitados mediante el uso de atmósferas inertes como nitrógeno o argón (Pacheco, 2010).

### **3.2.4 Formación de películas**

El quitosano es soluble en soluciones diluidas de ácidos minerales como: el ácido clorhídrico, a ácidos orgánicos como: el ácido acético, láctico y cítrico. Una vez disuelto, el quitosano es capaz de formar películas, mediante la evaporación del disolvente. Esta capacidad se debe a las interacciones electrostáticas entre el grupo amino protonado del quitosano y los iones carboxilato del ácido carboxílico (Ritthidej *et al.*, 2002).

Las películas de quitosano obtenidas mediante evaporación del disolvente, son amorfas y poseen propiedades de permeabilidad al vapor de agua similar a la del

celofán (Li *et al.*, 1997), son rígidas, durables, flexibles y difíciles de rasgar; la mayoría de sus propiedades mecánicas son comparables a las de algunos polímeros comerciales de mediano esfuerzo. Se ha reportado que las películas poseen valores moderados de permeabilidad al agua y pueden ser utilizadas para incrementar la vida de anaquel de productos frescos con altos valores de actividad de agua; asimismo también resultan ser excelentes barreras para la permeabilidad al oxígeno (Plascencia, 2004).

### 3.2.5 Modificación del quitosano

Pueden realizarse modificaciones químicas al quitosano, con el fin de cambiar sus propiedades físicas y químicas. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo en el grupo amino y en los hidroxilos primario y secundario. Las derivatizaciones posibles incluyen su entrecruzamiento, eterificación, esterificación y copolimerización (Lloyd *et al.*, 1998).

#### 3.2.5.1 Quitosano-ácido láctico

La síntesis del copolímero quitosano-ácido láctico es llevada a cabo a 80°C durante 2h (Espadín, 2012). Como se muestra en la figura 7, en primera instancia el grupo amino del quitosano se protona interactuando iónicamente con el ion carboxilato del ácido láctico. Posteriormente bajo determinadas condiciones de reacción se puede lograr la formación de un enlace amida entre el quitosano y ácido láctico y al mismo tiempo ocurre la policondensación del ácido láctico (Albertsson *et al.*, 1999).

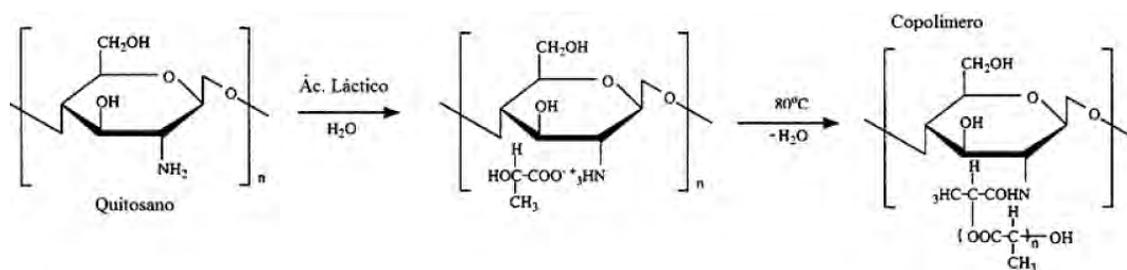


Figura 7. Copolimerización entre quitosano y ácido láctico

## 4. CARNE

La carne se define como la estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conectivo, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies animales autorizadas para el consumo humano (NOM-009-Z00-1994), y la carne fresca es la que, aparte de haber sido refrigerada, no ha recibido, a los efectos de su conservación, otro tratamiento que el envasado protector y que conserva sus características naturales (OMS,2009).

La carne de res es un alimento importante en la dieta de los seres humanos. Es consumida en casi todo el mundo por su aroma, sabor y textura. Desde el punto de vista nutricional, destaca por su alto contenido en proteínas de gran valor biológico, lípidos, hierro, selenio, así como vitaminas del complejo B y ácido fólico (Tabla 5) (Biesalski, 2005; McAfee *et al.*, 2010).

**Tabla 5.** Composición aproximada del músculo de mamífero adulto después del rigor mortis

Componente	Peso húmedo (%)
Agua	75 (0.99 aw)
Proteína	19.0
Lípidos	2.5
Glucógeno <sup>a</sup>	0.1
Glucosa <sup>ab</sup> e intermediarios glucolíticos	0.2
Ácido láctico <sup>a</sup>	0.9
Inosinmonofosfato <sup>b</sup>	0.3
Creatina <sup>b</sup>	0.6
Aminoácidos <sup>b</sup>	0.35
Dipéptidos (carnosina y anserina) <sup>b</sup>	0.35
pH <sup>a</sup>	5.5

<sup>a</sup> Varían de unos músculos a otros y entre animales distintos.

<sup>b</sup> Varían con el tiempo después del *rigor mortis*.

Basada en Lawrie (1985).

Su alto contenido de agua (alto valor de actividad acuosa), así como su contenido de nutrimentos necesarios para el crecimiento de bacterias y hongos (levaduras y mohos) hacen que la carne sea uno de los alimentos más perecederos (Ercolini *et al.*, 2006).

#### **4.1 Calidad de la carne**

La calidad se define como las características propias que tiene un producto y que le permiten al cliente valorarlo, o bien, las propiedades del producto, que permiten apreciarlo como igual, mejor o peor con respecto a otro similar. Al depender del cliente, se convierte en algo subjetivo, por lo que varía entre personas, en función de gustos, experiencia, cultura, región del país, etc.

La calidad de la carne, se puede considerar en términos de composición (relación entre fracciones magra-grasa), cantidad de nutrimentos o de los factores sensoriales (aspecto, color, olor, firmeza, jugosidad y sabor). En parte, estos criterios derivan del sistema de producción de los animales (crianza, genética, alimentación, entre otras) y de su adecuado proceso de transformación durante el faenado y procesado (rastros y obrador). Pero es en el punto de venta donde todo lo anterior se presenta ante el consumidor. Todos los aciertos y errores con que se haya realizado el proceso de producción de la carne no pueden mejorarse, pero fácilmente pueden deteriorarse en el punto de venta, particularmente por fallas en la higiene y en la cadena de frío. Del carnicero depende mantener el estándar de calidad con que recibió el producto.

Y es que debido a su alto contenido y disponibilidad de nutrimentos y humedad, la carne es muy susceptible a un rápido deterioro, causado principalmente por el desarrollo microbiano, así como por otros mecanismos como la oxidación de grasa, la degradación de las proteínas, que resulta en cambios de color y pérdida de humedad, entre otros.

## 4.2 MICROBIOLOGÍA DE LA CARNE

La carne (principalmente la cruda) además de ser altamente susceptible a deterioro, también puede constituir un vehículo para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Bhandare *et al.*, 2007; Podpečan *et al.*, 2007). Durante el sacrificio y procesamiento, todos los tejidos potencialmente comestibles pueden estar sujetos a contaminación por diversas fuentes, ya sea interna o externa al animal.

Las fuentes de contaminación de la carne se pueden dividir en dos: primarias y secundarias. Las fuentes primarias son: pelo, piel, patas, contenido estomacal y entérico, cavidades nasofaríngeas y porciones externas del tracto urogenital. Mientras que las secundarias son: superficies, equipamiento, y herramientas en la cadena de sacrificio, refrigerador y área de deshuesado (Norrung & Buncic, 2007). Sin embargo, se ha determinado que las carnes procesadas son más susceptibles a contaminarse con microorganismos patógenos durante las diferentes etapas de su procesamiento (Datta *et al.*, 2012). La presencia de patógenos en la cadena de producción de un alimento, aún en bajos números, es indeseable y se considera como la mayor causa de enfermedades gastrointestinales alrededor del mundo (McDonald y Sun, 1999).

Debido a la gran variedad de fuentes de contaminación, los tipos de microorganismos que suelen encontrarse en la carne de res son muchos y muy variables, por lo que es necesario indicar algunos factores que determinan la microbiología de la carne. Estos factores pueden ser clasificados en cuatro grupos: i) intrínsecos, ii) extrínsecos, iii) métodos de procesamiento y conservación e iv) implícitos (Huis in't Veld, 1996). En la tabla 6 se enlistan los principales factores de acuerdo con una modificación de la categorización clásica de Mossel (2003), adaptada para incluir a los nuevos procesos de conservación (Hui *et al.*, 2006).

**Tabla 6.** Principales factores implicados en la ecología microbiana de la carne

<b>Tipo</b>	<b>Principales factores</b>
<i>Intrínsecos</i> <sup>1,2</sup>	<p>pH</p> <p>Actividad de agua ( Aw)</p> <p>Potencial redox (Eh)</p> <p>Nutrientes</p> <p>Viscosidad</p> <p>Microestructura</p> <p>Antimicrobianos naturales</p>
<i>Procesamiento</i> <sup>2</sup>	<p>Temperatura (Pasterización y esterilización)</p> <p>Radiación gamma</p> <p>Presión hidrostática alta</p> <p>Aditivos antimicrobianos (Conservadores)</p> <p>Envasado (Vacío, atmósferas modificadas)</p>
<i>Extrínsecos</i> <sup>1,2</sup>	<p>Temperatura de almacenamiento (Refrigeración, Congelación)</p> <p>Atmósfera gaseosa ambiental</p>
<i>Implícitos</i> <sup>1,2</sup>	<p>Humedad ambiental</p> <p>Microorganismos (Naturaleza microbiana)</p> <p>Microbiota natural (Competencia, sinergismo)</p>

McDonald & Sun (1999)<sup>1</sup>, Hui *et al.* (2006)<sup>2</sup>.

Para tratar de determinar la calidad microbiológica de la carne, frecuentemente se utiliza la búsqueda y cuantificación de microorganismos indicadores, los cuales, aunque pueden no ser patógenos, su presencia indica la probabilidad de que también pueden estar presentes microorganismos patógenos (Wolffs y Radstrom,

2006). Estas determinaciones incluyen la cuenta de bacterias mesofílicas viables totales, coliformes totales, bacterias del grupo Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, estreptococos fecales y *Aeromonas* (Algino *et al.*, 2009); aunque también se ha sugerido incluir en este rubro de indicadores a bacterias como *Listeria* spp., enterococos y bifidobacterias (Delcenserie *et al.*, 2008; Gill y Jones, 1995).

Los microorganismos patógenos que históricamente se han asociado a brotes por el consumo de carne, incluyen *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y no-O157 productoras de toxina shiga, *Listeria*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* y *Yersinia*, aunque los primeros tres se ha reportado que actualmente son los más importantes como patógenos en carne de res (Koochmaraie *et al.*, 2005). Se ha establecido que para algunos microorganismos tales como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Clostridium* spp, las principales medidas para lograr su control se enfocan en intervenciones durante las últimas etapas de la producción de la carne (Nørrung *et al.*, 2009).

#### **4.2.1 *Salmonella typhimurium*.**

Al inicio del siglo XIX, patólogos clínicos en Francia documentaron la asociación de la ulceración intestinal humana con un agente contagioso; la enfermedad fue denominada como fiebre tifoidea y posteriormente investigadores Europeos aislaron y caracterizaron al bacilo tifoideo responsable de ésta, mientras que en los Estados Unidos, Salmon y Smith en 1885, aislaron de carne de puerco a *Bacillus cholerae-suis*, ahora conocido como *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*.

##### **4.2.1.1 Características**

Es un bacilo Gram-negativo de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, anaerobio facultativo, no esporulados; perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Aunque los miembros de este género son capaces de moverse por medio de flagelos peritricos, existen variantes no móviles, *S. enterica* serovar *pullorum* y *S. enterica* serovar *gallinarum*, así como cepas no móviles debido a la presencia de flagelos disfuncionales. Las especies de *Salmonella* son quimioorganótrofas, con habilidad para metabolizar

nutrientes por las vías fermentativa y respiratoria. Las bacterias crecen óptimamente a 37°C y pueden catabolizar la D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y gas. Estos microorganismos son oxidasa negativos y catalasa negativos, crecen en citrato como única fuente de carbono, generalmente producen ácido sulfhídrico, descarboxilan la lisina y ornitina, y no hidrolizan la urea (Terragno *et al.*, 2003). La mayoría de estas características se utilizan para la identificación bioquímica de cepas aisladas de *Salmonella*.

#### 4.2.1.2. Factores físicos y químicos de desarrollo

Las salmonelas se multiplican bien en medios de cultivo ordinarios, las colonias post incubación por 18 a 24 horas a 32 °C son de 2 a 3 mm de diámetro salvo algunos serotipos que producen colonias pequeñas; con algunas excepciones no presentan cápsula (Smith *et al.* 1952; Suter 1956). Los miembros del género *Salmonella* crecen en un amplio rango de temperaturas (7 – 28 °C), el rango de pH ideal para su crecimiento es entre 6,6 y 8,2; son incapaces de tolerar altas concentraciones de sal y sobreviven en agua congelada durante periodos prolongados (Jawetz *et al.* 2005).

Tabla 7. Límites de crecimiento y sobrevivencia de *Salmonella*

Parámetro	Mínimo	Máximo	Sobrevivencia
Temperatura (°C)	7	49	< 5
pH	4,8	9,5	4,0
Actividad de agua ( $a_w$ )	0,94	0,99	< 0,94
% NaCl	-	-	9

Ellermeier & Schlauch, 2006.

#### 4.2.2 *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos fueron descritos por primera vez por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston como causa de algunas infecciones piógenas (formadoras de

pus) en las personas. En 1882 les dio el nombre de estafilococo (del griego staphyle racimo de uvas y coccus un grano de baya) por el aspecto que presentaban al microscopio (Adams *et al.*, 1997).

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram-positiva, mesófila, anaerobia facultativa, cuya morfología microscópica es de cocos de 0,5 – 1 µm de diámetro con agrupación característica en racimos, cadenas cortas o diplococos, cuyo hábitat natural son las vías respiratorias especialmente la nariz y garganta, así como la superficie de la piel de seres humanos y otros mamíferos, incluso personas que gozan de buena salud pueden ser portadoras de este microorganismo (Bernard *et al.*, 1984; Brock *et al.*, 1991).

Además es un microorganismo patógeno del cual aproximadamente el 50% producen alguna enterotoxina, principalmente las enterotoxinas A y E se encuentran relacionadas con intoxicaciones alimentarias. Es un microorganismo halotolerante y puede resistir condiciones incluso de desecación (Bernard *et al.*, 1984; Jay *et al.*, 2007).

En la tabla 8 se resumen las condiciones de crecimiento y sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y además las condiciones de producción de alguna de sus enterotoxinas, en donde se confirma su halotolerancia.

**Tabla 8.** Requerimientos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* y requerimientos para la generación de enterotoxinas

Factor	crecimiento		Producción de entero toxina	
	óptima	Intervalo	óptima	Intervalo
Temperatura °C	35 - 37	7 - 48	35 - 40	10 – 45
pH	6,0 - 7,0	4,0 - 9,8	5,3 – 6,8 Otras: 6 - 7	
NaCl	0,5 - 4 %	0 - 20 %	0,5 %	0 - 20 %
Actividad de	0,98 - > 0,99	0,83 - > 0,99	> 0,99	0,86 - > 0,99

agua			
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica – Anaeróbica	Aeróbica – Anaeróbica
E <sub>h</sub>	> +200 mV	> +200 mV	> +200 mV

Adams et al., 1997

### 4.3 Envases para la conservación de la carne

Los productos cárnicos se ubican dentro de los más fáciles de descomposición por ser un medio ideal de cultivo para microorganismos (patógenos y deteriorantes) (Ercolini *et al.*, 2006; Villada *et al.*, 2006). Uno de los aspectos más importantes es mantener la calidad e inocuidad, de tal forma que el consumidor tenga la garantía de que al ingerir ese alimento su salud no se verá afectada. Dentro de las características deseables por el consumidor, y que marcan la decisión de compra del producto, se encuentran la frescura y el color rojo estable y brillante de la superficie de la carne (Charles *et al.*, 2006; Sorheim y Nissen, 2008).

Para alcanzar lo anterior y preservar la calidad es importante considerar el empaque y el material de este, ya que existe influencia parcial de las propiedades de los materiales de fabricación (Taik, 2010). Dentro de la tecnologías más utilizadas para el empaque de carnes frescas y productos cárnicos se encuentran las películas permeables y semipermeables al aire y otros gases, el empaque al vacío y en atmosfera modificadas (Belcher, 2006).

#### 4.3.1 Técnicas de conservación de carne fresca

La tecnología que se ha utilizado para empacar la carne fresca y los productos cárnicos procesados ha consistido principalmente en el empackado permeable al aire, atmosfera modificada y empaque al vacío. Este último es considerado por algunos autores como una forma de empackado en atmosferas modificadas (Belcher, 2006). A continuación se describen algunos:

#### **4.3.2 Charola de espuma de poliestireno convencional**

La charola de espuma de poliestireno convencional, con o sin almohadilla absorbente y con una película envolvente de cloruro de polivinilo, es una técnica comúnmente encontrada en el mercado mexicano debido a la facilidad de su utilización, tecnología sencilla y bajo costo. Sin embargo, la vida útil del producto no se prolonga considerablemente debido a que facilita la proliferación de microorganismos aunque, por otra parte, para los productos procesados, sobre todo para los de baja humedad, como los chorizos, este es un empaque adecuado (Taik, 2010).

#### **4.3.3 Sistemas al vacío**

El hecho de mantener la carne bajo condiciones libres de O<sub>2</sub>, extiende la vida de anaquel considerablemente. Empacar al vacío no ha sido un método exitoso para la venta de carne, posiblemente porque esta adquiere un color púrpura, oscuro y con presencia de exudado visible en el empaque. Esta técnica se ha mejorado usando doble película, donde la superficial es impermeable y desprendible (empaque madre) y la interior permite la penetración de O<sub>2</sub>, por lo que la carne adquiere un color rojo brillante (Charles *et al.*, 2006; Sorheim y Nissen, 2008).

#### **4.3.4 Atmósferas modificadas**

Consiste en eliminar el aire dentro del empaque que contiene la carne o producto cárnico, para posteriormente inyectar un gas o mezcla de gases. Se ha modificado el ambiente gaseoso a fin de reducir el grado de respiración y con ello disminuir el crecimiento microbiano y, por lo tanto, retrasar el deterioro debido a la producción de metabolitos microbianos y a la actividad enzimática residual de la carne; con ello se logra un mayor periodo de anaquel del producto (García *et al.*, 2006). La vida útil de la carne empacada en atmósferas modificadas aumenta entre 10 y 15% cuando se utiliza una película con permeabilidad al O<sub>2</sub> por debajo de 2 cm<sup>3</sup>. m<sup>2</sup>.dia.atm<sup>-1</sup> (Taik, 2010), teniendo cuidado de que la carne empacada no sea expuesta a altas concentraciones de O<sub>2</sub>, ya que acelera el crecimiento de microorganismos aerobios y favorece la oxidación de lípidos y mioglobina.

Para lograr mayor conservación de las características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas de los productos, se sugiere aplicar atmosferas con mayor concentración de CO<sub>2</sub>, ya que disminuye la tasa del crecimiento de microorganismos aerobios y, al mismo tiempo, menor concentración de oxígeno (O<sub>2</sub>), el cual se usa con frecuencia para mantener el color rojo de la carne (Ospina y Cartagena, 2008).

Las atmosferas enriquecidas con CO<sub>2</sub> inhiben además bacterias Gram negativas como algunos psicótrofos y *Pseudomonas* spp. Sin embargo, es posible que ocurran cambios deteriorantes debido al crecimiento, aunque a menor tasa, de microorganismos facultativos, tales como *Carnobacterium* spp., *Brochothrix thermosfacta* y *Lactobacillus* spp. (Fraqueza y Barreto, 2009).

Cabe señalar que las atmosferas generalmente contienen O<sub>2</sub> residual, ya que se encuentra disponible en pequeñas cantidades en el tejido muscular o en el aire, lo que hace inevitable su incorporación en la atmosfera circundante del empaquetado, o bien, porque permea a través de la película durante el almacenamiento. Lo anterior resulta riesgoso para el color y la vida de anaquel de la carne, ya que esta es muy vulnerable al O<sub>2</sub> residual, por lo que es posible que este atributo de calidad se modifique. Autores como Sorheim y Nissen (2008) han registrado que niveles superiores a 2% de O<sub>2</sub> residual en las atmosferas modificadas incrementan el desarrollo microbiano. Sin embargo, si se utilizan altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en combinación con un pH (potencial de hidrogeno) bajo y almacenamiento en frío, la inhibición de microorganismos es muy eficiente (Ercolini *et al.*, 2006).

#### **4.3.5 Películas plásticas utilizadas para empaque**

Las mejoras en la calidad y vida útil de los productos alimenticios se ha logrado en parte por el control de los gases y la permeabilidad del vapor de agua (Taik, 2010); debido a los efectos deteriorantes del oxígeno, el uso de películas que actúen

como una barrera contra la entrada de este gas al interior del empaque ha cobrado cada día mayor importancia en la industria cárnica. La calidad de los alimentos empacados está influenciada parcialmente por las propiedades de los materiales que forman parte de estos, como las películas plásticas y la composición de las charolas de poliestireno.

Por ello, las películas impermeables o semipermeables han sido desarrolladas para regular el paso del gas y de la humedad del medio hacia el interior del empaque, para mejorar las propiedades de barrera y sellado que faciliten la cocción del producto en autoclave.

La elección de la película para empacar productos cárnicos depende en gran medida del tiempo que se supone requerirá el alimento permanecer empacado, además de las condiciones del lugar de almacenamiento, tales como temperatura y humedad (Ospine y Cartagena, 2008).

Los materiales que son utilizados en el empacado de los productos cárnicos son generalmente poliméricos con buenas características de barrera para el O<sub>2</sub>, como las poliamidas, el polietileno y el polipropileno, que son eficientes barreras contra la humedad y muestran buenas características de sellado (Pettersen *et al.*, 2004).

El polietileno de baja densidad y el cloruro de polivinilo son los principales plásticos empleados en el empacado, aunque también se usa el poliestireno.

El polipropileno es químicamente similar al polietileno y puede ser producido como extruido para proporcionar características de sellado por calor. El polipropileno tiene mayores intervalos en las propiedades de barrera hacia el vapor de agua que el polietileno; y llega a proporcionar efecto de barrera a los gases de hasta siete a diez veces más y tener una excelente resistencia a las grasas. En su forma no plastificada, el cloruro de polivinilo es la lámina base termo formable más ampliamente utilizada para empacado en atmósferas modificadas. Este polímero posee buena capacidad de barrera hacia los gases y moderada hacia el vapor de agua, y posee excelente resistencia a grasas y aceites (Ospina y Cartagena, 2008).

#### 4.3.6 Gases para el empaquetado de carne

En el empaquetado en atmósferas modificadas se pueden utilizar uno o más gases, normalmente dispersos en el aire, pero en diferentes concentraciones.

Rara vez se utiliza un solo gas y las mezclas dependen del tipo y propósito del empaquetado. A continuación se describen los gases de mayor uso para empaque de carne:

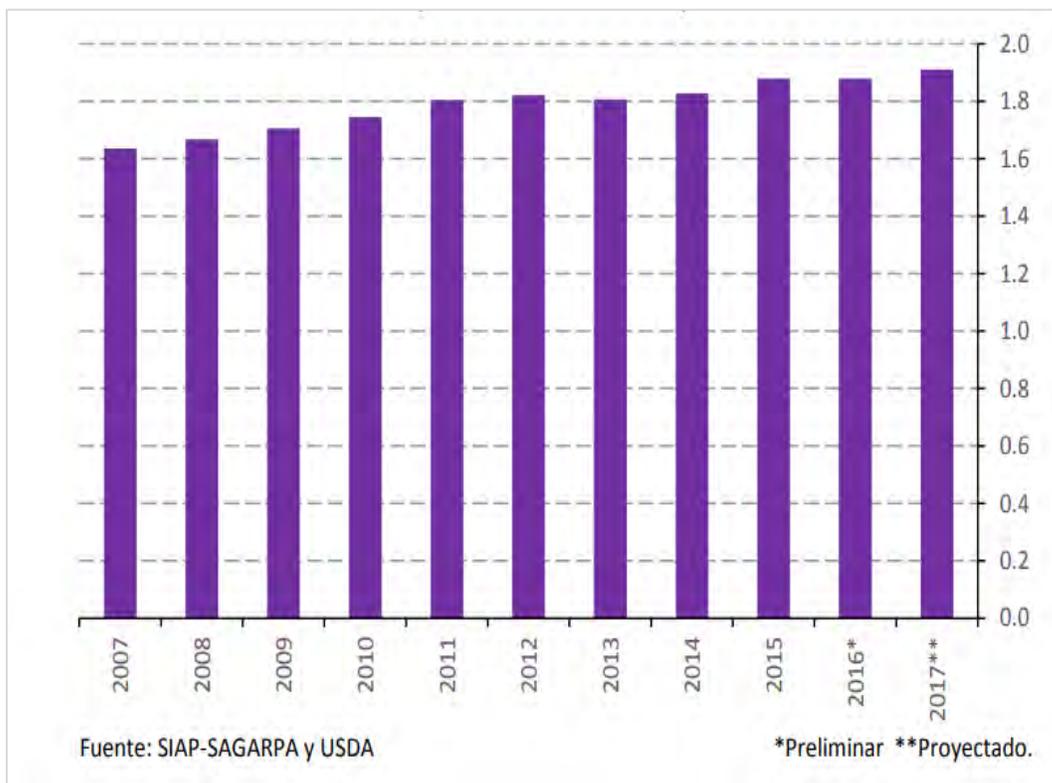
- *Oxígeno ( $O_2$ )*: este gas acelera el crecimiento de las bacterias aerobias que afectan la conservación de la carne; por lo tanto, su eliminación permite alargar la vida de anaquel desde el punto de vista microbiológico. El  $O_2$  tiene un efecto fundamental en el color de la carne, ya que a niveles altos (60 a 80%) se genera un color brillante, mientras que a niveles bajos (0.1 a 0.5%) se favorece la oxidación del pigmento y favorece cambios en la coloración de la carne. Una atmósfera modificada libre de  $O_2$  produce un color púrpura o rojo oscuro.
- *Dióxido de carbono ( $CO_2$ )*: el efecto que produce este gas es la disminución de la tasa de crecimiento de los microorganismos aerobios; además, en medio acuoso se produce ácido carbónico que también tiene efecto bacteriostático. Sin embargo, en esta atmósfera pueden crecer microorganismos anaerobios. El intervalo de concentración empleado es de entre 20 y 90%, teniendo mayor efectividad conforme se incrementa su concentración. Como todos los gases, es soluble en soluciones acuosas, incluyendo el tejido magro con alto contenido de humedad. Su solubilidad es de  $1 \text{ L.kg}^{-1}$  de masa cárnica y, al igual que los otros gases, la solubilidad aumenta al disminuir la temperatura. Es relevante señalar que el  $CO_2$  no afecta directamente a los componentes químicos de la carne; promueve un cambio de color de rojo brillante de la oximioglobina hasta tonos grisáceos, debido a la hipoxia producida por el mismo gas en el sistema, lo que impide la oxigenación de la mioglobina.
- *Nitrógeno ( $N_2$ )*: es un gas inerte de menor solubilidad que el  $CO_2$  que se utiliza como gas de relleno para impedir que el empaque se colapse, en particular cuando la atmósfera modificada tiene alta concentración de  $CO_2$ . Este gas no

tiene ningún efecto directo en el crecimiento microbiológico o en el color de la carne (Sorheim y Nissen, 2008).

- *Monóxido de carbono (CO)*: Es muy efectivo para mantener el color rojo, debido a la formación de carboximioglobina. Este gas inhibe el crecimiento de algunos patógenos. Su uso se ha autorizado en condiciones controladas de 0.2 a 0.4%, para no ser considerado por la legislación como tóxico al consumidor (García *et al.*, 2006).

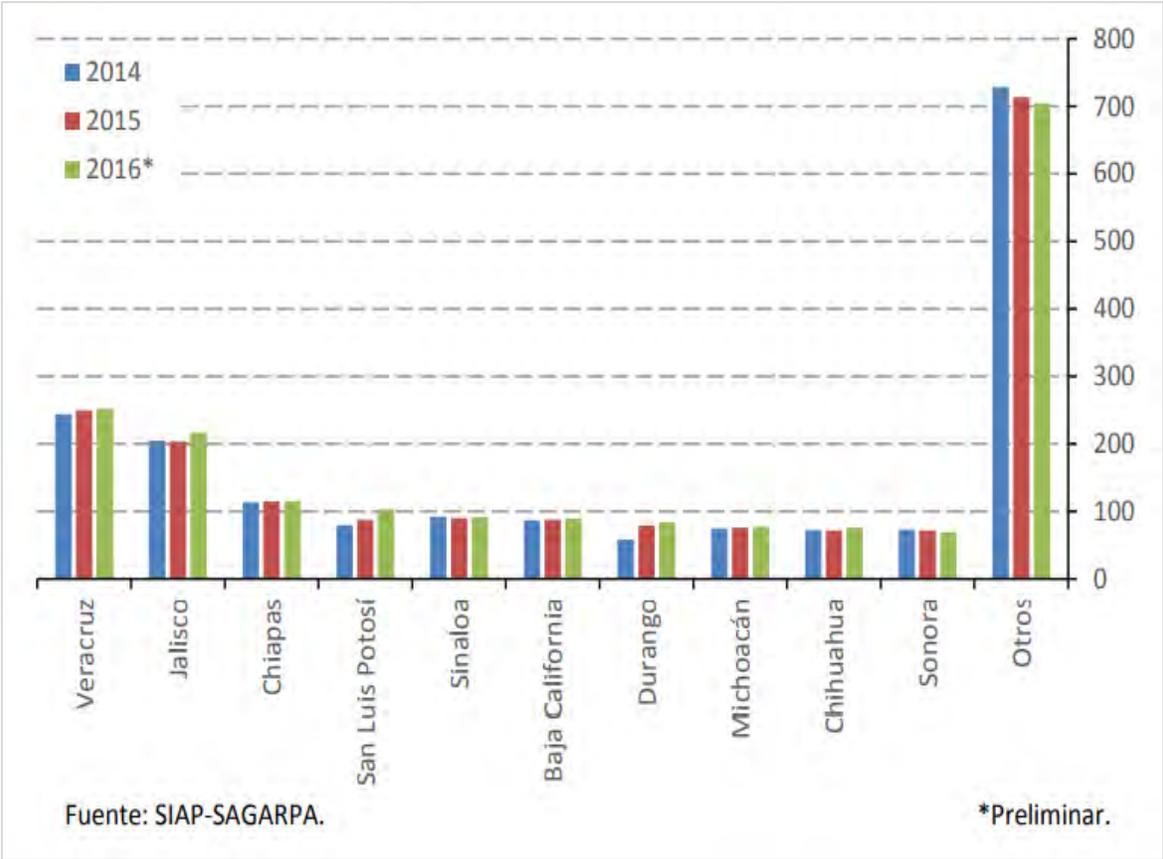
#### 4.4 Mercado Nacional

Producción primaria Durante la década reciente la producción nacional de carne de bovino ha presentado un continuo crecimiento, con excepción de 2013. Así, entre 2007 y 2016, creció a una tasa media anual de 1.6 %, para ubicarse en 1.88 millones de toneladas de carne en canal (figura 8).



**Figura 8.** Producción de carne de bovino en México, 2007 - 2017 (Millones de toneladas).

En 2016 (figura 9), el 62.5 % de la producción nacional de carne de bovino se concentró en diez entidades: Veracruz (13.4 %), Jalisco (11.5 %), Chiapas (6.1 %), San Luis Potosí (5.5 %), Sinaloa (4.9 %), Baja California (4.8 %), Durango (4.5 %), Michoacán (4.1 %), Chihuahua (4.0 %) y Sonora (3.7 %).



**Figura 9.** Principales productores de carne de bovino, 2014-2016

(Miles de toneladas).

El consumo per cápita de carne de bovino en México se ha reducido, entre 2007 y 2016, a una tasa media anual de 2.1 por ciento, al pasar de 18.0 a 14.8 kg por persona por año. En tanto, el consumo per cápita de otras carnes, como la de pollo y la de cerdo, muestra un comportamiento diferente, con una tasa de crecimiento promedio anual de 2.0 y 3.3 por ciento durante el citado período, respectivamente. Así, se espera que en 2017 el consumo per cápita de carne de bovino se ubique en 14.8 kg, el de carne de cerdo en 19.0 kg, y el de carne de pollo en 33.8 kg.

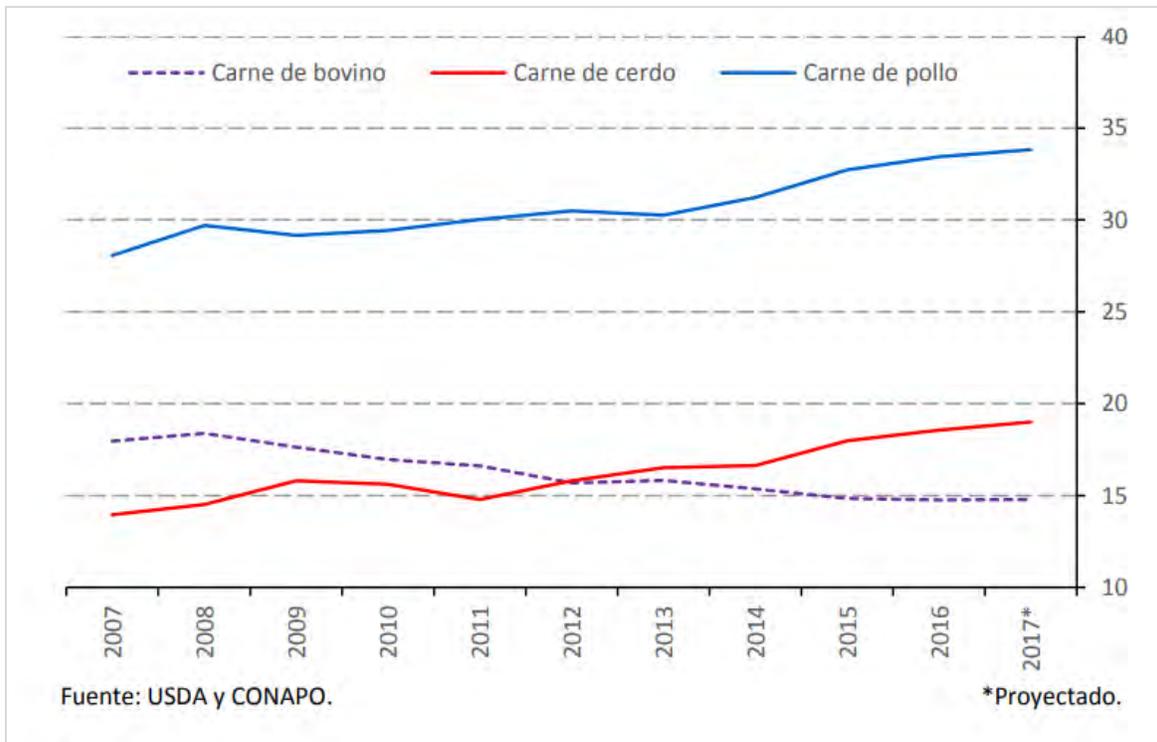


Figura 10. Consumo per cápita de carne en México

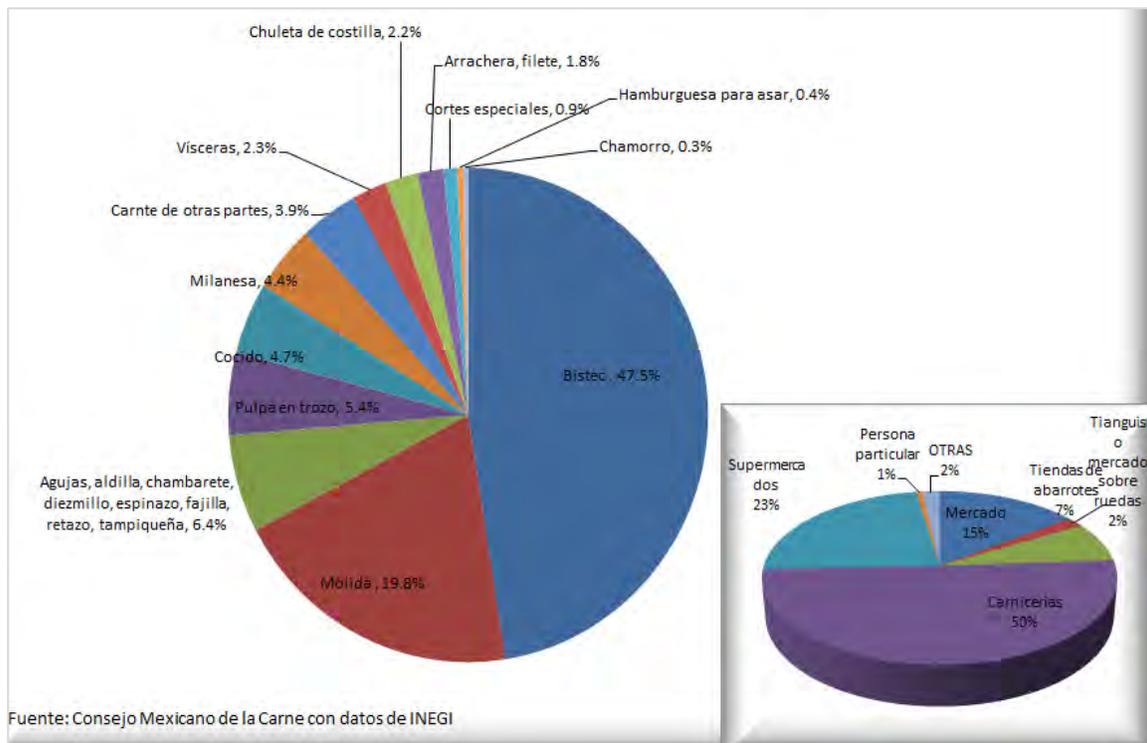


Figura 11 Preferencia de consumo de tipo de carne y lugar de compra.

## Antecedentes

### Estudios realizados con películas de quitosano

Zamudio (2008) reportó que las películas de quitosano son delgadas, elásticas y resistentes y presentan una excelente adhesión a una gran variedad de superficies. Las propiedades de las películas varían en función del origen y método de obtención del quitosano, pero poseen generalmente valores medios o moderados de permeabilidad al vapor de agua y actúan como buena barrera al oxígeno, así como las propiedades mecánicas de tales películas fueron comparables a las de polímeros comerciales de mediana resistencia.

Casariago *et al.* (2009) prepararon películas a partir de disoluciones a 3 % (m/v) de quitosano en ácido láctico a 1% (v/v), empleando glicerol, sorbitol y polietilenglicol como plastificante en concentraciones de 0,25 a 0,50 (mL/g) de quitosano. Midieron el esfuerzo a la tensión, elongación, fuerza de ruptura, deformación y el espesor de las películas, con el objetivo de evaluar la influencia de la masa molar y concentración de plastificante sobre sus propiedades mecánicas. Las películas con polietilenglicol, presentaron mayor esfuerzo a la tensión y fuerza de ruptura normalizada que las plastificadas con glicerina o sorbitol, pero resultaron menos elásticas y deformables, además, mientras mayor fue la concentración de plastificante, más elásticas resultaron las películas y menor fue el esfuerzo necesario para su ruptura

Araya *et al.* (2010) reportó la influencia de los ácidos acético, fórmico y láctico en las características físico químicas de las películas de quitosano. Las películas presentaron mayor resistencia a la tensión al ser tratadas con ácido acético y ácido láctico. Por espectroscopia de infrarrojo se logró apreciar las bandas características de las películas de quitosano, demostrando que la parte estructural química tiene ligeras variaciones dependiendo del ácido utilizado para su formación.

Sandoval *et al.* (2014) preparó y caracterizó películas de quitosano entrecruzado con ácido láctico aplicada en queso obteniendo una disminución en la pérdida de

peso y contenido de agua en los quesos, de igual manera controló el crecimiento de bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* mediante el uso de materiales basados en quitosano como envase primario. La tasa de permeabilidad de agua se redujo por la adición de proteína de soya y almidón de arroz. Los materiales mostraron superficie homogénea por las observaciones de SEM.

## **Tratamientos de conservación en carne**

En la actualidad se ha observado casos de intoxicaciones y muertes humanas alrededor del mundo debido a la contaminación de los alimentos de origen animal con patógenos perjudiciales para la salud. Es por esto que varias tecnologías se han investigado, desarrollado y aplicado para mejorar la inocuidad alimentaria. Dentro de estos métodos se encuentran la utilización de bioembalajes con polímeros naturales con una alta actividad antimicrobiana. Cabe mencionar que la mayoría de estudios se han hecho para productos cárnicos y carne fresca (cerdo, pollo y pescado) y pocos en carne de res.

Baranenko *et al.* (2013) estudió la composición, las propiedades y la actividad antibacteriana de los recubrimientos a base de quitosano utilizados para el almacenamiento en frío de carne de cerdo y productos cárnicos. Todos los recubrimientos redujeron el recuento viable total de microorganismos en comparación con las muestras de control sin revestimiento. Los recubrimientos comestibles basados en quitosano desarrollados pueden usarse para aumentar la vida útil y mejorar los parámetros de seguridad microbiana de la carne y los productos cárnicos.

Bonilla *et al.* (2014) prepararon películas comestibles basadas en quitosano, con y sin aceites esenciales de albahaca o tomillo, con el objetivo de evaluar su capacidad protectora contra la oxidación de lípidos y su actividad antimicrobiana. Las películas de quitosano tenían buenas propiedades de barrera contra el oxígeno, que mejoraron por la adición de aceites esenciales, aumentado especialmente cuando la película equilibra el contenido de humedad. Debido al

efecto de la barrera de oxígeno, las películas fueron efectivas para proteger la grasa de cerdo de la oxidación, en comparación con muestras sin recubrir. Las películas con aceites esenciales fueron más efectivas que los del quitosano solo. Las películas fueron efectivas para controlar el crecimiento microbiano en carne de cerdo.

Sharafati *et al.* (2015) prepararon películas de quitosano con aceites esenciales (eucalipto y comino). Sus efectos antibacterianos fueron evaluados para microorganismos como, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* y *Shigella dysenteriae*. Los aceites esenciales tuvieron efectos antibacterianos en las cuatro bacterias examinadas. En todos los grupos de tratamiento, hubo una disminución de bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras. La carne que contiene quitosano con 0.5% de aceite esencial de comino fue mejor. Por lo tanto, podría sugerirse el uso de quitosano combinado con comino y eucalipto como un envase antibacteriano para extender la vida útil y como sabor potenciador de carne de pollo.

Alnoman *et al.* (2016) evaluaron los efectos inhibitorios del quitosano contra la germinación de las esporas de *Clostridium perfringens*, en carne de pollo. El quitosano mostró fuerte actividad inhibitoria contra *C. perfringens* en carne de pollo. Los resultados contribuyen a una mejor comprensión de la posible aplicación de quitosano en productos cárnicos cocidos para controlar la enfermedad asociada a *C. perfringens*.

## JUSTIFICACIÓN

El elevado contenido nutricional de la carne, por su alta fuente de proteína y su grado de consumo en el país, ha motivado a estudiar los diferentes métodos de conservación del alimento. Por lo general los microorganismos presentes en estos productos causan deterioro, malos olores y cambios en las características físicas. Por otro lado el uso de materiales poliméricos (plásticos) utilizados en la industria de alimentos para la elaboración de envases y empaques cuya función principal es conservar, proteger, transportar y almacenar alimentos; son altamente consumidos y desechados, generando grandes cantidades de residuos sólidos no biodegradables a corto plazo. Por lo que, los materiales a base de polímeros naturales pueden resultar una forma innovadora para envasar y conservar alimentos reduciendo, así el uso de envases no degradables.

## **HIPÓTESIS**

Las películas a base de quitosano funcionalizadas con ácido láctico y plastificante, serán antimicrobianas, permitiendo su uso como envase primario en la conservación de carne molida de bovino.

## OBJETIVO GENERAL

Formular y evaluar películas antimicrobianas a partir de quitosano, como envase primario en carne molida de bovino para su conservación.

## OBJETIVOS PARTICULARES

### Etapal

- Obtener quitosano mediante desacetilación de la quitina extraída por método biológico/ químico y caracterizado mediante las técnicas espectroscópicas:
  - Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA).
  - Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN)

### Etapa II

- Formular y preparar películas a base de quitosano, funcionalizado con ácido láctico, con y sin plastificante (glicerol, sorbitol y polietilenglicol).
- Caracterizar las películas mediante las técnicas espectroscópicas:
  - Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA).
  - Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN)
  - Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)
- Determinar las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de las películas
- Determinar las propiedades antimicrobianas *invitro* de las películas, empleando cepas de (*Salmonella typhimurium*. y *Staphylococcus aureus*).

### Etapa III

- Determinar el efecto antimicrobiano y las propiedades fisicoquímicas de las películas como envase primario de carne molida.

## Capítulo II. Metodología Experimental

El desarrollo experimental, se dividió en tres etapas: en la etapa I se realizó la obtención y caracterización de quitosano; en la etapa II se realizó a la formulación, preparación y caracterización de películas a base de quitosano, quitosano/ ácido láctico (QLA), quitosano/ ácido láctico/glicerol (QLG), quitosano/ ácido láctico/sorbitol (QLS) y quitosano/ ácido láctico/ polietilenglicol (QLP). En la etapa III se evaluaron las películas como envase primario y su efecto inhibidor contra *Salmonella typhimurium*. y *Staphylococcus aureus*. En la figura 12 se presenta un esquema de la metodología experimental.

### II.1 Materiales

Los materiales empleados para la obtención del quitosano:

Se obtuvo quitina a partir de cefalotórax de camarón mediante un método biológico/químico.

- Ácido clorhídrico (HCl) A.C.S. (Reactivos Química Meyer, México).
- Hidróxido de sodio (NaOH) grado industrial (Casa Miyako, México).

Materiales empleados para la formulación y preparar las películas

Quitosano obtenido mediante desacetilación heterogénea de quitina

- Ácido láctico 85% (J.T. Baker, México)
- Glicerol (J.T. Baker, E.E.U.U.)
- NaOH al 50% (Grado industrial)
- Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O
- Polietilenglicol (Fluka, E.E.U.U.)
- Sorbitol (J.T. Baker, E.E.U.U.)
- Acetato de potasio (KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) (J.T. Baker, E.E.U.U.)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Nitrato de potasio hexahidrato (Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O) (Fluka, E.E.U.U.)

Materiales empleados para la evaluación de películas como envase

- Se empleó carne molida de bovino (sirloin) obtenida en un supermercado local ubicado en la Delegación Tláhuac de la Ciudad de México, almacenada a  $4\pm 1$  °C.
- Platos de unicel
- Película de cloruro de polivinilo (PVC)

Materiales para el análisis microbiológico y microorganismos

- Agar baird Parker (Bioxon, México)
- Agar para métodos estándar (Bioxon, México)
- Agar para *Salmonella* y *Shigella* (Bioxon, México)
- Caldo soya tripticaseína (Dibico, México).
- *Salmonella typhimurium*. (ATCC 140228) (Facultad de química, UNAM, México) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25953) (Lab. Bioquímica de Macromoléculas UAMI, México).

## **II.2 Etapa I. Obtención y caracterización del quitosano**

El quitosano se obtuvo mediante desacetilación heterogénea de la quitina cruda, empleando NaOH 50% (p/v) en relación 1:15 (p/v) con respecto a la quitina, en un reactor tipo columna a una temperatura de 110°C durante 3h (Juárez-Castelán, 2010). Posterior a la reacción de desacetilación, el quitosano fue enjuagado con agua potable hasta su neutralidad y secado a 40°C durante 48 h.

### **II.2.1 Caracterización de quitosano**

#### **II.2.1.1 Determinación del porcentaje de humedad, cenizas y proteína residual**

El contenido de humedad se determinó de acuerdo con el método de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (A.O.A.C., 1990 por sus siglas en inglés) se pesaron 2 g de muestra en un crisol, previamente sometido a peso constante. La muestra se colocó dentro de una estufa convencional (Lab-line, U.S.A) a 100°C por 12 h. Después las muestras fueron calcinadas y colocadas en una mufla (ISB-Linderberg, México) a 550°C durante 12 h para cuantificar las cenizas. El

porcentaje de humedad y cenizas fue calculado por diferencia de peso de la muestra al inicio y al final de cada proceso.

La proteína residual se calculó determinando el nitrógeno total. Las muestras fueron digeridas en tubos de digestión tipo Kjeldahl de 300 mL, empleando una unidad de digestión Büchi B-426 que fue conectada a un lavador de gases Büchi B-412 para atrapar los vapores de trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>). La destilación de las muestras digeridas se realizó en una unidad Büchi B-323 (Espíndola 2017).

#### **II.2.1.2. Determinación del porcentaje de solubles en solución de ácido acético**

Se determinó disolviendo 0.1g de quitosano en 25 mL de solución de ácido acético (0.1M), la solución se mantuvo en agitación magnética durante 24h a temperatura ambiente (Juárez-Castelán, 2010). Transcurrido este tiempo, se filtró la disolución empleando papel filtro Whatman No. 30, previamente sometido a peso constante. El papel filtro con el material insoluble se secó en una estufa (Lab-line, U.S.A) a 100°C durante 3 h, posteriormente se pesó y se determinó la cantidad de quitosano insoluble por diferencia de peso. El porcentaje de solubles se calculó restando el valor de quitosano insoluble (*q<sub>ins</sub>*) a la cantidad de quitosano pesado inicialmente en base seca (*q<sub>i</sub>*), se dividió entre la cantidad de quitosano inicial y se multiplicó por 100 (Ec.1).

$$Solubles = \frac{q_i - q_{ins}}{q_i} \times 100\% \dots [1]$$

#### **II.2.1.3 Peso molecular**

El peso molecular del quitosano se obtuvo mediante la viscosidad intrínseca con un viscosímetro de Ostwald, de soluciones de quitosano con concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 g/L en una solución de ácido acético glacial (2 %) y acetato de sodio (0.2 M). El peso molecular (*M<sub>w</sub>*), se calculó con la ecuación 3 de Mark – Houwink- Sakurada, en donde los valores empleados de las constantes *k* y *a* fueron 1.38X10<sup>-5</sup> g/L y 0.85 respectivamente.

$$[n] = k Pw^a \dots [2]$$

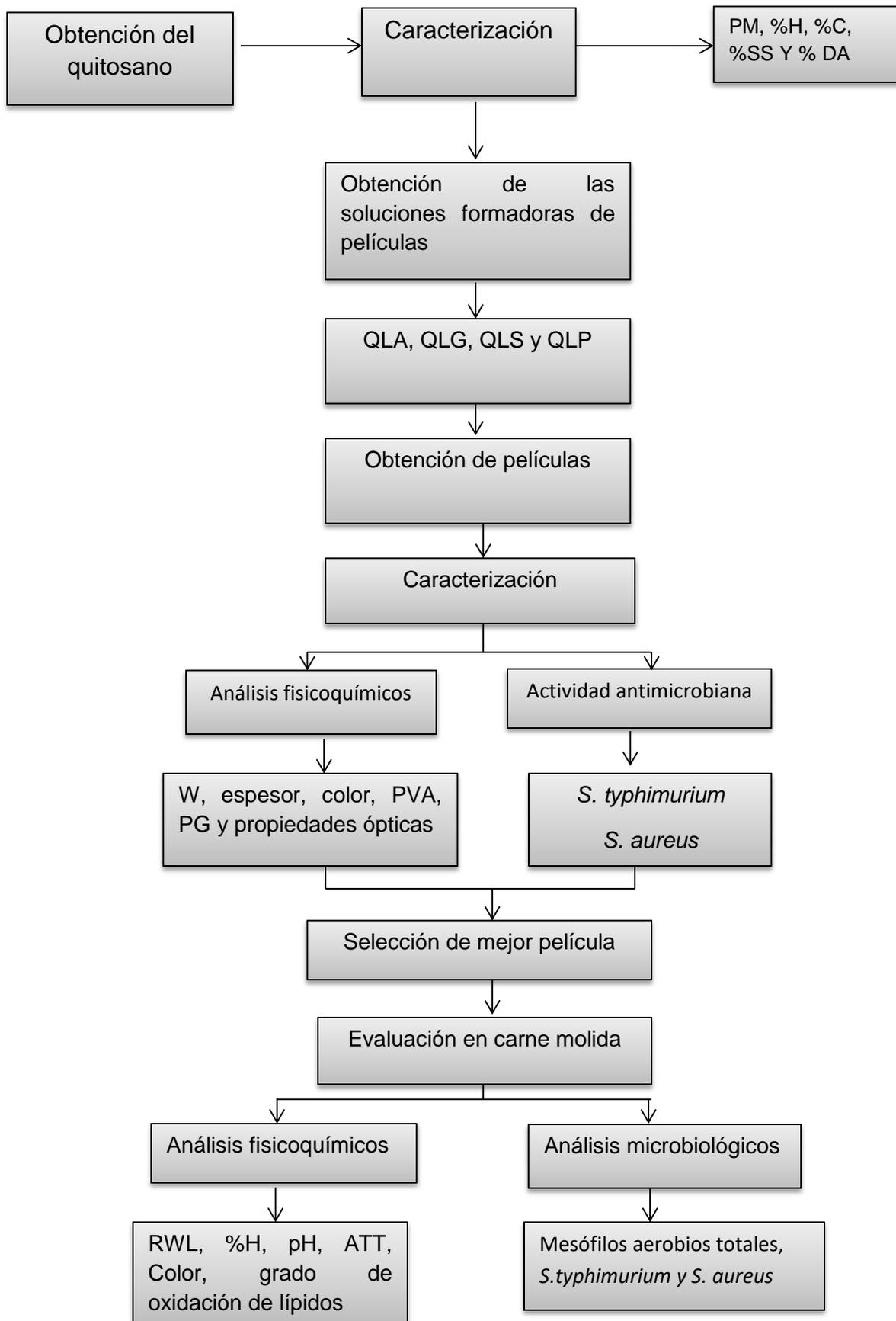


Figura 12. Metodología experimental

#### **II. 2.1.4. Grado de acetilación**

El grado de acetilación (DA), se determinó mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMNH) en un espectrómetro (Bruker Advance III 500, Alemania) a 500 Mhz para H<sup>1</sup>. Con los espectros de RMN, se obtuvieron las áreas correspondientes al grupo metilo y los masivos A y B, integrando las curvas con el programa "Spinworks" (V2.5.5) (Pacheco, 2010). Posteriormente los valores de las áreas obtenidos se sustituyeron en la Ec. 3.

$$\%DA = \left[ \frac{\frac{1}{8} A_{CH_3}}{\frac{1}{6} \sum_{i=2}^6 A_{H_i}} \right] \times 100 \dots [3]$$

#### **II.2.1.5 Espectroscopia de Absorción en el Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (IRTF-RTA)**

La espectroscopia FT-IR se utilizó para determinar los grupos funcionales presentes en quitosano y los espectros de las películas se obtuvieron por ATR (Reflectancia Total Atenuada) en un espectrómetro FTIR (Perkin Elmer modelo Spectrum 100, UK) en la región de 4000 a 550 cm<sup>-1</sup> con 32 escaneos por muestra.

### **II.3 Etapa II. Formulación, preparación y caracterización de películas QLA, QLG, QLS y QLP**

#### **II.3.1 Obtención de las soluciones formadoras de película**

##### **II.3.1.1 Películas de quitosano ácido láctico (QLA)**

El quitosano se solubilizó en una concentración de 1.15% (p/v) en una solución de ácido láctico 0.3 M, en agitación magnética constante durante tres días, posteriormente la solución se filtró, con el fin de eliminar el quitosano insoluble. Después la disolución de quitosano con ácido láctico se tapó herméticamente y se calentó a 80 °C durante 2h (Albertsson *et al.*, 1999; Espadín, 2014).

#### **II.3.1.2 Películas de quitosano ácido láctico y glicerol (QLG)**

El quitosano se solubilizó en una concentración de 1.15% (p/v) en una solución de ácido láctico 0.3 M, en agitación magnética constante durante tres días, posteriormente la solución se filtró, con el fin de eliminar el quitosano insoluble. Después se agregó glicerol en una proporción de 10 % con respecto al quitosano. La disolución se tapó herméticamente y se calentó a 80 °C durante 2h (Orendain, 2008, Espadín, 2014).

#### **II.3.1.3 Películas de quitosano ácido láctico y sorbitol (QLS)**

El quitosano se solubilizó en una concentración de 1.15% (p/v) en una solución de ácido láctico 0.3 M, en agitación magnética constante durante tres días, posteriormente la solución se filtró, con el fin de eliminar el quitosano insoluble. Después se adicionó sorbitol en una proporción de 10 % con respecto al quitosano. La disolución de quitosano con ácido láctico y sorbitol se tapó herméticamente y se calentó a 80 °C durante 2h (Albertsson *et al.*, 1999; Espadín, 2012).

#### **II.3.1.4 Películas de quitosano ácido láctico y polietilenglicol (QLP)**

El quitosano se solubilizó en una concentración de 1.15% (p/v) en una solución de ácido láctico 0.3 M, en agitación magnética constante durante tres días, posteriormente la solución se filtró, con el fin de eliminar el quitosano insoluble; se agregó polietilenglicol en una proporción de 10 % con respecto al quitosano. La disolución de quitosano con ácido láctico y polietilenglicol se tapó herméticamente y se calentó a 80 °C durante 2h.

#### **II.3.2 Preparación de películas**

Las películas se obtuvieron por “casting” se pesaron 30 g de la solución correspondiente a cada formulación en cajas Petri de poliestireno. Posteriormente se secaron en estufa a 55 °C durante 24 h.

### II.3.3 Caracterización de las películas

#### II.3.3.1 Rendimientos

Para obtener el rendimiento se consideró la cantidad de quitosano y la cantidad de ácido láctico empleados, así como el peso de la película obtenida (Ec. 4).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso de película}}{\text{Peso de quitosano} + \text{Peso del ácido láctico}} * 100 \dots [2]$$

#### II.3.3.2 Porcentaje de incorporación

Para obtener el porcentaje de incorporación se purificaron las películas empleando un equipo soxhlet. Se pesaron las películas correspondientes a cada formulación, se colocaron en papel filtro, previamente sometido a peso constante y se colocaron en el equipo soxhlet con acetona durante 8 h (Avérous, 2008) (por ser GRAS) para corroborar la formación del enlace amida y retirar por completo el ácido láctico y oligos (lactato) que no reaccionó.

El porcentaje de incorporación de ácido láctico se estimó en forma gravimétrica como se muestra en la Ec. 5.

$$\% \text{ incorporación} = \frac{\text{peso de película} - \text{peso del quitosano inicial}}{\text{peso de película}} * 100 \dots [3]$$

#### II.3.3.3 Espectroscopia de ATR-FTIR

Seguir metodología descrita en el punto II.2.1.5

#### II.3.3.4 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (1H-RMN)

Para el análisis 1H-RMN las muestras se disolvieron en agua deuterada (D<sub>2</sub>O) y ácido clorhídrico (HCl) concentrado. Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo (BRUKER modelo AVANCE-III 500, Alemania) empleando una BBID de 5mm con z-gradiente de campo. En todos los casos los espectros se obtuvieron a 298°K a 500 Mhz.

### II.3.3.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes obtenidas por SEM, se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900LV, Japón). Las películas, se fijaron en una cinta de carbono adherida a un porta muestras de aluminio. Posteriormente se recubrieron con una capa fina de oro para evitar que la muestra se cargara.

### II.3.3.6 Relación molar (RM) y porcentaje de fracción molar (%FM)

De los espectros de RMN obtenidos se integraron las áreas correspondientes al grupo metilo del ácido láctico (1.4 ppm) y los masivos A y B del quitosano, integrando las curvas con el programa "Spinworks" (V2.5.5, Canadá). Posteriormente los valores de las áreas obtenidos se sustituyeron en la ecuación 6.

$$\%FM = \left( \frac{\frac{1}{3} \text{Area integrada de } CH_3}{\frac{1}{6} \sum_2^6 \text{Area integrada de } H_i + \frac{1}{3} \text{Area integrada de } CH_3} \right) * 100 \dots [6]$$

### II.3.3.7 Acondicionamiento

Las películas fueron acondicionadas en una cámara ambiental con una HR de 40  $\pm$ 2 % alcanzada con una solución saturada de Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, a temperatura ambiente durante tres días.

### II.3.3.8 Peso de las películas

Una vez formadas las películas, las cajas Petri fueron pesadas en una balanza analítica (OHAUS, U.S.A), El peso de las películas se determinó por diferencia de peso considerando el peso de la caja Petri vacía.

### II.3.3.9 Espesor

El espesor de las películas se determinó con un micrómetro digital (Mitutoyo 1D-C112E, Japón), se realizándose cinco mediciones en distintas áreas de la película. El valor de los espesores es el promedio obtenido cada película.

### II.3.3.10 Color

El color de las películas se determinó con un colorímetro (Minolta CR200, Osaka Japón). Para calibrar el equipo se utilizó una placa de color blanco ( $L=97.75$ ,  $a=0.49$ ,  $b=1.96$ ). El sistema proporciona los valores de tres componentes de color;  $L^*$  (componente negro-blanco, luminosidad) y coordenadas de cromaticidad,  $a^*$  (componente +rojo a -verde) y  $b^*$  (componente +amarillo a -azul). Se realizaron cinco determinaciones en diferentes áreas de las películas.

$$\Delta E = (L^*-L_0^*)^2 + (a^*-a_0^*)^2 + (b^*-b_0^*)^2]^{1/2} \dots [7]$$

Siendo  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  los valores obtenidos de las películas y  $L_0^*$ ,  $a_0^*$ ,  $b_0^*$ , los valores de referencia.

El índice de color (CI) se determinó con la siguiente ecuación (Murillo- Martínez y col, 2010):

$$CI = (a^*1000) / (L^*b^*) \dots [8]$$

Valores de CI entre -40 y -20 corresponden al rango del color que va desde violeta a verde oscuro; valores entre -20 y -2 corresponden a muestras con colores entre verde oscuro y amarillo verdoso; valores entre -2 y +2 indican color verde amarillento. Por otra parte, CI entre +2 y +20 corresponden a muestras de color amarillo pálido a naranja intenso y entre +20 y +40 indican color desde naranja intenso a rojo oscuro.

### I.3.3.11 Propiedades Ópticas (Transparencia y Opacidad)

Las propiedades ópticas de las películas, se determinaron en un espectrofotómetro UV-visible (Thermospectronic, E.E.U.U.), las mediciones se hicieron en un intervalo de longitud de onda entre 200 y 700 nm (Fang y col., 2002). La Transparencia de las películas se obtuvo a partir de la absorbancia medida a 300 nm (Shiku y col, 2004), el cálculo se realizó con la Ec.9:

$$\%T_{300} = A/b \times 100 \dots [9]$$

Donde  $T_{300}$  es la transparencia a 300 nm,  $A_{300}$  es la absorbancia a 300 nm y  $b$  es el espesor de la película (mm).

La opacidad se calculó integrando el área bajo la curva del espectro de absorbancia de la película, entre 200 y 600 nm. La opacidad es expresada en unidades de absorbancia (UA) por nm (Hewage y Vithanarachchi, 2008).

#### **II.3.3.12 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)**

La PVA fue medida según una modificación de la técnica gravimétrica ASTM E96-80 (Miranda *et al.*, 2003). Para esta prueba se generaron dos gradientes de % HR 78/22 y 22/78. Se utilizó una celda de vidrio (con un diámetro de  $2 \pm 0.01$  cm, altura de  $5 \pm 0.1$  cm), en la cual se colocó una solución saturada de  $KCH_3CO_2H$  ( $\approx 10$  g) para generar una HR de 22%. Posteriormente las películas previamente cortadas, se sujetaron entre el anillo y la boca de las celdas de vidrio y se sellaron con parafilm. Se registró el peso inicial del sistema (celda más película) y fueron transferidas a un desecador de tapa esmerilada que contenía una solución saturada de NaCl ( $\approx 25$  mL) para generar la HR de 78 % previamente acondicionada. De esta forma se obtuvo el gradiente de humedad 22/78. Para el otro el gradiente 78/22 se invirtieron las sales, en donde la celda de prueba contenía una solución saturada de NaCl y la cámara ambiental una solución saturada de  $KCH_3CO_2$ . La prueba se efectuó a  $4 \pm 1^\circ C$  durante 30 días haciendo mediciones cada 24 h. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Se graficó la pérdida o ganancia de peso contra el tiempo, obteniéndose la pendiente (J). A partir de este valor, se determinó la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA), así como la permeabilidad al vapor de agua (PVA) con las siguientes ecuaciones:

$$VTVA = \frac{J}{t.A} \dots [10]$$

En donde, VTVA= velocidad de transmisión de vapor de agua

t= tiempo

A= área expuesta de la película

$$PVA = \frac{VTVA}{Pw_1 - Pw_2} * L \quad \dots [11]$$

En donde:

PVA= permeabilidad al vapor de agua

L= espesor de la película

Pw<sub>1</sub>= presión parcial de vapor en la celda de prueba

Pw<sub>2</sub>= presión parcial vapor en la cámara ambiental

### II.3.3.13 Permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono (PO<sub>2</sub> y PCO<sub>2</sub>)

Se utilizó el método descrito por Ayranci et al. (1999), para determinar la permeabilidad al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de las películas. Para esta prueba se utilizaron frascos pequeños de vidrio, las películas fueron cortadas en círculos (D=20 mm) y previamente acondicionadas (40 ± 1%HR a 25 °C), posteriormente las películas previamente cortadas, se sujetaron entre el anillo y la boca de los frascos, se sellaron con una engargoladora y fueron colocados en un desecador, el cual se adicionó CO<sub>2</sub> (10%). El desecador se mantuvo a 25 ±1 °C durante 48 h. De esta manera, el O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> transmitido a través de la película fue determinado por cromatografía de gases (GOW-MAC 580). La transmisión de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> a través de las películas fue calculada mediante la ecuación 12.

$$P = \frac{T}{\Delta p} * b \dots [12]$$

Donde P es la permeabilidad al CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, T es la transmisión al gas, Δp es la diferencia de presiones entre la presión de los frascos y la del desecador y b es el espesor de las películas.

### II.3.3.14 Determinación de propiedades mecánicas

Se evaluó la fuerza de fractura en la punción y la fuerza de fractura en la extensión. Las muestras fueron analizadas en un equipo SINTECH 1/S (MTS, USA) con una celda de carga de 100 y 500 N, se intercambiaron las mordazas entre las dos pruebas (extensión y punción) respectivamente

#### **II.3.3.14.1 Acondicionamiento de las películas**

Las películas se colocaron en un desecador, según lo establecido en el ASTM D618-00 (ASTMD618-00, 2003), a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $41 \pm 1\%$ HR por 48 h con una disolución de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (250 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua).

#### **II.3.3.14.2 Medición del espesor**

El espesor de las películas se midió después de acondicionar con un micrómetro (Mitutoyo 1D-C112E, Japón) en cinco posiciones aleatorias para cada película, a lo largo de la muestra. Los cálculos se realizaron con los promedios.

#### **II.3.3.14.3 Fuerza de fractura por la tensión**

La fuerza de fractura por tensión se determinó bajo la norma ASTM D882-97 (ASTMD882-97, 2003) a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). Las películas previamente acondicionadas se cortaron en tiras de  $2 \pm 0.1$  cm de ancho por  $8 \pm 0.1$  cm de largo. Las tiras se sujetaron por los extremos de las mordazas fabricadas *ex profeso* para medir su resistencia a la tensión o estiramiento. Los materiales se estiraron a una velocidad de 100 mm/min hasta romperlo. Se realizaron cinco mediciones para cada material

#### **II.3.3.14.4 Fuerza de fractura en la punción**

Fue determinada con el método descrito por Gontard *col.*, (1993). Las películas previamente acondicionadas fueron cortadas en círculos de 8 cm de diámetro, se sujetaron entre dos placas circulares con un orificio central y una punta de 0.013 m de diámetro y de superficie lisa se hizo descender verticalmente a una velocidad de 500 mm/min hasta penetrar la película. Se realizaron cinco mediciones para cada material, midiendo en tiempo real la fuerza para penetrar cada material.

#### **II.3.3.14.5 Modulo de Young**

Constante de proporcionalidad introducida en la ley de Hooke, la cual se puede calcular como:

$$\theta = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} = E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \dots \text{Ec. [4]}$$

Donde  $\sigma$  es el cambio en el esfuerzo unitario (MPa) y  $\varepsilon$  es la deformación unitaria

### **II.3.3.15 Actividad antimicrobiana**

#### **II.3.3.15.1 Acondicionamiento**

Las películas se cortaron en tiras de 5 mm de ancho por 15 mm de largo tomando en cuenta la medida de los tubos eppendorf (2 unidades experimentales y 1 control), estos se esterilizaron por UV en crosslinker BLX-254 (Vilber Lourmat), ambas caras del polímero por 10 min.

#### **II.3.3.15.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana**

Las cepas empleadas fueron *Salmonella typhimurium*. (ATCC14028) y *Staphiloccoccus aureus* (ATCC 25923) las cuales fue conservada en glicerol a 4°C y el inóculo fue preparado en caldo soya tripticaseína a 36 °C por 12h.

El crecimiento bacteriano se determinó mediante la inoculación de 50  $\mu$ L de la suspensión de bacterias a una concentración de  $1 \times 10^7$  bacterias/mL en caldo soya tripticaseína, se colocaron los materiales y se incubaron a 36 °C, se tomaron muestras cada 2 h hasta un tiempo final de 24 h (por duplicado) registrándose la absorbancia (595 nm).

### **II.4 Etapa III. Evaluación de películas como envase y efecto inhibidor contra *S. typhimurium* y *S. aureus* en carne (molida) de bovino**

Se evaluó la efectividad de las películas seleccionadas como envase y posible inhibidor de *S.typhimurium* y *S. aureus* en carne molida. Se utilizó carne no inoculada e inoculada además de un control el cual corresponde a carne molida sin recubrir, se empacaron en platos de unicel, la película de quitosano y cloruro de polivinilo.

#### **II.4.1 Preparación del inóculo de *S. typhimurium* y *S. aureus***

Se preparó el inóculo, tomando una asada del microorganismo en cultivo sólido, en 25mL de caldo soya tripticaseína, el cual se incubó a 37°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se determinó la densidad óptica a 560 nm en un espectrómetro de UV-visible (Thermospectronic, E.E.U.U.), utilizando como blanco el medio de cultivo estéril. Posteriormente se realizó el conteo en placa, realizando diluciones decimales empleando solución salina estéril (0.9 % p/v) e inoculando por duplicado para cada dilución 0.1 mL en cajas Petri con agar soya tripticaseína por extensión superficial. Las cajas invertidas se incubaron a 37 °C por 24 h. La cantidad de microorganismos fue establecida en  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  UFC/mL para *S. typhimurium* y *S. aureus* respectivamente (Mariani *col.*, 2011), diluyendo en solución salina estéril 0.9% (p/v) cuando fue necesario de acuerdo a la densidad óptica.

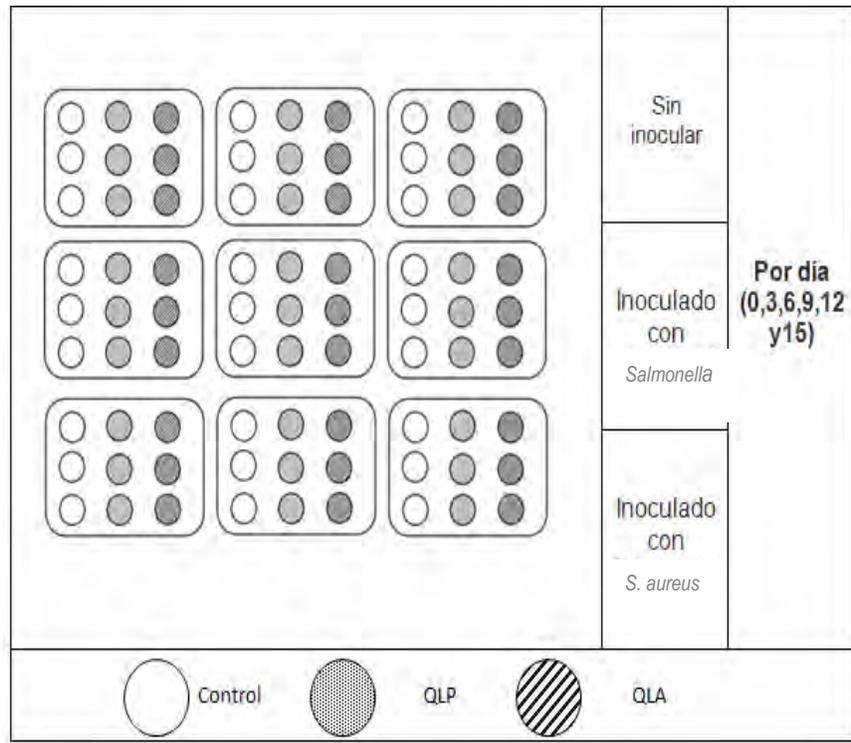
##### **II.4.1.1 Inoculación de *S.typhimurium* y *Sta. aureus* a la carne molida**

Se adicionó 700  $\mu$ L de la suspensión ( $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  UFC/mL) de *S.typhimurium* y *S. aureus* respectivamente, en un área de 25 cm<sup>2</sup> (5x5 cm), delimitada en una tabla de plástico de dimensiones (42 x 25cm), previamente esterilizada en autoclave a 121°C por 15min. A continuación se colocaron en las áreas delimitadas la carne, dejándose en contacto con la suspensión durante 30 min una de los lados de la carne, una vez transcurrido el tiempo, se depositaron 700  $\mu$ L de la suspensión y se dio vuelta a la carne. Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar.

##### **II.4.1.2 Envasado de la carne**

La carne se cubrió con las películas de quitosano, previamente sometidas a una esterilización por UV en crosslinker BLX-254 (Vilber Lourmat), ambas caras del material por 10 min, posteriormente la carne recubierta con las películas se colocaron en platos de unicel en condiciones asépticas y se cubrieron con cloruro de polivinilo (PVC).

Se empacaron por triplicado las muestras de carne inoculadas y no inoculadas a 4 °C y una HR de 78 ±1%. Se almacenaron durante 15 días, se tomaron muestras cada 72 h. En la figura 13 se muestra un resumen del diseño experimental



**Figuran 13** Diseño experimental de carne inoculadas con *S. typhimurium* y *S. auresus* recubierta con los materiales a 4°C y 78 % HR

## II.4.2 Análisis de carne

### II.4.2.1 Pérdida relativa de peso (RWL)

La carne se peso al inicio del estudio (WI) y posteriormente a los 3, 6, 9, 12, y 15 días de almacenamiento considerándose este valor como el peso final (WF) (Cerqueira *et al.*, 2007), obteniéndose la RWL con la siguiente ecuación:

$$RWL = \frac{WI-WF}{WI} * 100 \dots [5]$$

### II.4.2.2 Humedad

La humedad se determinó de acuerdo al método de la (A.O.A.C., 1990), se pesó 2g de muestra y se seco en estufa convencional (Lab-line, E.E.U.U.) hasta peso

constante a 100°C. El porcentaje de humedad fue calculado por diferencia de peso de la muestra al inicio y al final de cada proceso.

#### **II.4.2.3 pH y acidez total titulable (ATT)**

Se peso 10 g de muestra y se homogenizó con 100 mL de agua destilada durante 5 min con un procesador de alimentos. Posteriormente se filtro la solución con gasa. Se determinó por triplicado el pH con un potenciómetro digital (Hanna Instruments, Italia). Se titularon 25 mL de la solución con NaOH valorada (0.1N), añadiendo cinco gotas de fenoftaleína (1% p/v) como indicador ácido-base, hasta el vire del indicador.

#### **II.4.2.4 Color**

Seguir la metodología mencionada en el punto II.3.3.10

#### **II.4.2.5 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Se peso 2.5 g de muestra y se homogenizó con 10 mL de ácido tricloroacético al 5 % (p/v); se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 mn, posteriormente se filtró a través de papel filtro Whatman del No. 4; por triplicado se transfirió 2 mL del filtrado a tubos de ensaye, se adicionó 2 mL de ácido-tiobarbitúrico (TBA), se taparon y colocaron en un baño maría, manteniendo en ebullición por 30 mn, transcurrido el tiempo se dejó enfriar los tubos en un baño de hielo por 10 mn, se determinó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Thermospectronic, E.E.U.U.); se reportó el valor en mg MDA/ kg de carne.

#### II.4.2.6 Análisis microbiológico

Se homogenizó 10 g de carne molida con 90 mL de solución salina estéril (0.9% p/v) durante 1 mn en una licuadora (marca Oster, Mod. M6798-13). La suspensión obtenida correspondió a la dilución primaria, A partir de ésta, se realizaron diluciones decimales transfiriendo 1 mL a tubos falcon con 9 mL de solución salina estéril (NOM- 110-SSA1-1994). Se inocularon alícuotas de 100  $\mu$ L por el método de extensión (figura 14), en placas de agar para método estándar (mesófilos aerobios totales), agar Salmonella-Shigella y agar baird parker, para la cuenta total de *S. typhimurium* y *S. aureus* respectivamente, por triplicado. Las placas se invirtieron e incubaron por 48 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  para realizar la cuenta de mesófilos; en el caso de *S. typhimurium* y *S. aureus*. Se observaron las cajas y se contaron las colonias características de *S. typhimurium* (colonias medianas, incoloras con centro negro) y *S. aureus* (colonias negras brillantes con halo claro).

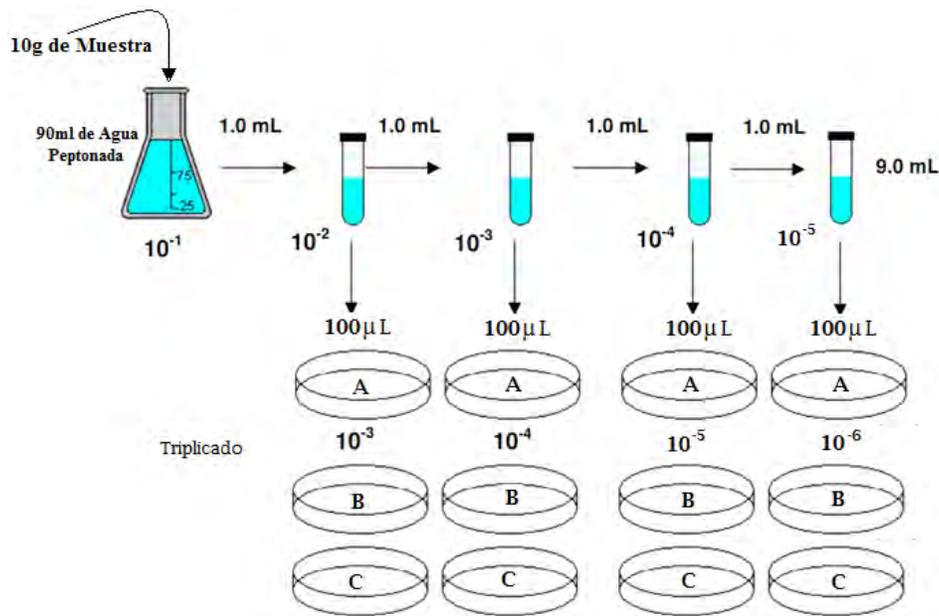


Figura 14. Cuenta en placa de bacterias (Brock 2006)

## Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### III.1 Etapa I. obtención y caracterización del quitosano

Se utilizó un lote de quitina cruda (quitina obtenida de fermentación ácido láctica) FAL), la quitina fue desaceitada durante 4 h con NaOH al 50 % (p/v). El quitosano obtenido fue caracterizado cuantitativamente mediante humedad, cenizas, grado de acetilación, solubilidad y peso molecular, los resultados obtenidos son el promedio de tres determinaciones, los cuales se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Caracterización del quitosano

Lote	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)	Solubilidad (%)	DA (%)	M <sub>w</sub> (kDa)
Quitosano (PP4)	7.36±0.17	0.26 ±0.07	0.00±0.00	93.74± 0.28	12.86±0.43	253.38±0.17

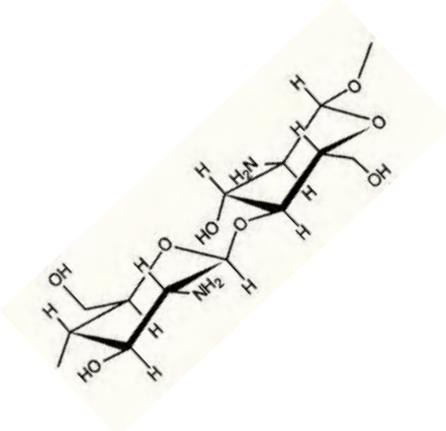
El quitosano obtenido se encuentra dentro del intervalo de humedad 6-7 % reportado por Pillai col. (2009), el contenido de cenizas después de DA fue de 0.26% el cual fue similar con los quitosanos comerciales; Sigma Chemical 0.2 %, Dupont 0.2 %, Cho col. (2008). El grado de acetilación es uno de los factores más importantes que influyen en las propiedades de este biopolímero debido al rol que juega en la solubilidad (Pacheco, 2010); se ha observado que los quitosanos disponibles comercialmente poseen un DA del 10- 20% (Gacén y Gacén, 1996), Chou *et al.* (1998) reportaron el DA de algunos quitosanos comerciales como por ejemplo: Sigma-Aldrich (10.1±1.1), Pronova Biopolymer (17.0±0.0), DuPont (27.5±0.0). El quitosano conseguido en este trabajo se encuentra dentro del intervalo y es ligeramente superior al de Sigma-Aldrich; como se mencionó anteriormente se ve reflejado en la solubilidad 93.74 %, Ravi Kumar (2000), establece que la solubilidad se produce por la protonación del grupo amino, convirtiendo el quitosano en un polielectrolito, cuando se encuentra en medios ácidos.

El peso molecular del quitosano obtenido fue de  $M_w$  de 253.38±0.17 g/mol, de acuerdo a lo reportado por Zheng & Zhu (2003), el quitosano  $M_w < 350$  kDa tiene

mayor efecto antimicrobiano, debido a que permea la célula microbiana con mayor facilidad interfiriendo con el metabolismo.

Se realizó espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR) para corroborar la estructura química del quitosano obtenido. En la Tabla 10 se muestran las bandas características de los grupos funcionales del espectro de quitosano.

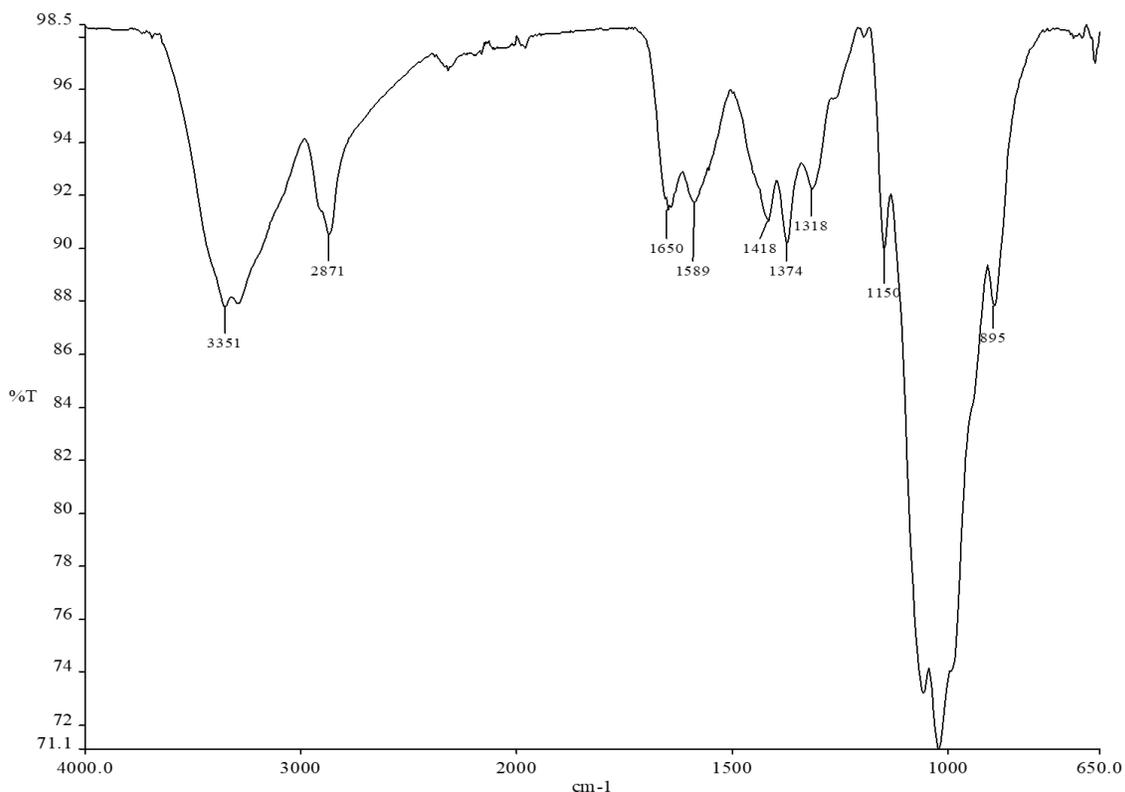
**Tabla 10.** Bandas características de los grupos funcionales del espectro de quitosano

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionales	Estructura del quitosano
3357.40	Grupos –OH del polímero	
3290.31	Grupo N-H	
2918.41 y 2851.65	Grupo C-H	
1647.04	Grupo –NH de amina primaria	
1574.71	Grupo –NH <sub>2</sub>	
1417.00	Grupo –CH <sub>2</sub>	
1377.84	-CH <sub>3</sub> y C-CH <sub>3</sub>	
1318.06	Amida terciaria	
1151.54	Tención asimétrica del grupo COC	
1070.26 y 1026.65	Vibraciones del esqueleto de los grupos C-O, C-O-C	
891.85	C-H de los grupos anoméricos	

Duarte *et al*, 2002

El espectro de ATR-FTIR (fig.15), muestra las señales características las cuales aparecen en: 3351 cm<sup>-1</sup> propias de los grupos OH del polímero, a 3293 cm<sup>-1</sup> aparece el grupo N-H, las bandas en 2921 y 2871 cm<sup>-1</sup> corresponden al grupo -CH, en 1650 cm<sup>-1</sup> aparece la banda característica del grupo –NH de una amida primaria asociada con los restos del grupo acetoamida después de la desacetilación, en 1589 cm<sup>-1</sup> aparece el grupo amino –NH<sub>2</sub>, 1418 cm<sup>-1</sup> corresponde al grupo –CH<sub>2</sub>, en 1374 cm<sup>-1</sup> aparecen el grupo –CH y deformación del C-CH<sub>3</sub>, en 1318 cm<sup>-1</sup> se encuentra la banda que corresponde a uan amida

terciaria, la banda en  $1150\text{ cm}^{-1}$  es característica de la tensión asimétrica del grupo C-O-C, las vibraciones del esqueleto propias de la estructura de quitosano aparecen en  $1029.4$  y  $1064.3\text{ cm}^{-1}$  y por último en  $895.5\text{ cm}^{-1}$  aparece la tensión –CH de los grupos anoméricos (Maza *et al.*, 2007).



**Figura 15.** Espectro ATR-FTIR de quitosano, obtenido mediante desacetilación de quitina extraída por un método biológico-químico.

## III.2 Etapa II. Formulación, preparación y caracterización de películas QLA, QLG, QLS y QLP

### III.2.1 Formulación de quitosano-ácido láctico

El quitosano tiene 2 grupos reactivos, los grupos amino libres en las unidades desacetiladas y los grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C6 en las unidades acetiladas y desacetiladas (Hirano, 1999; Corona, 2011), cuando el quitosano se disuelve en la solución de ácido láctico los grupos amino se protonan debido a la disminución del pH y se formó la sal de lactato amino quitosano, al calentar la

solución se formaron los grupos amida entre el quitosano y el ácido láctico por la pérdida de agua en la sal (Espadín et al., 2014), por lo que al evaporar el agua se obtiene las películas.

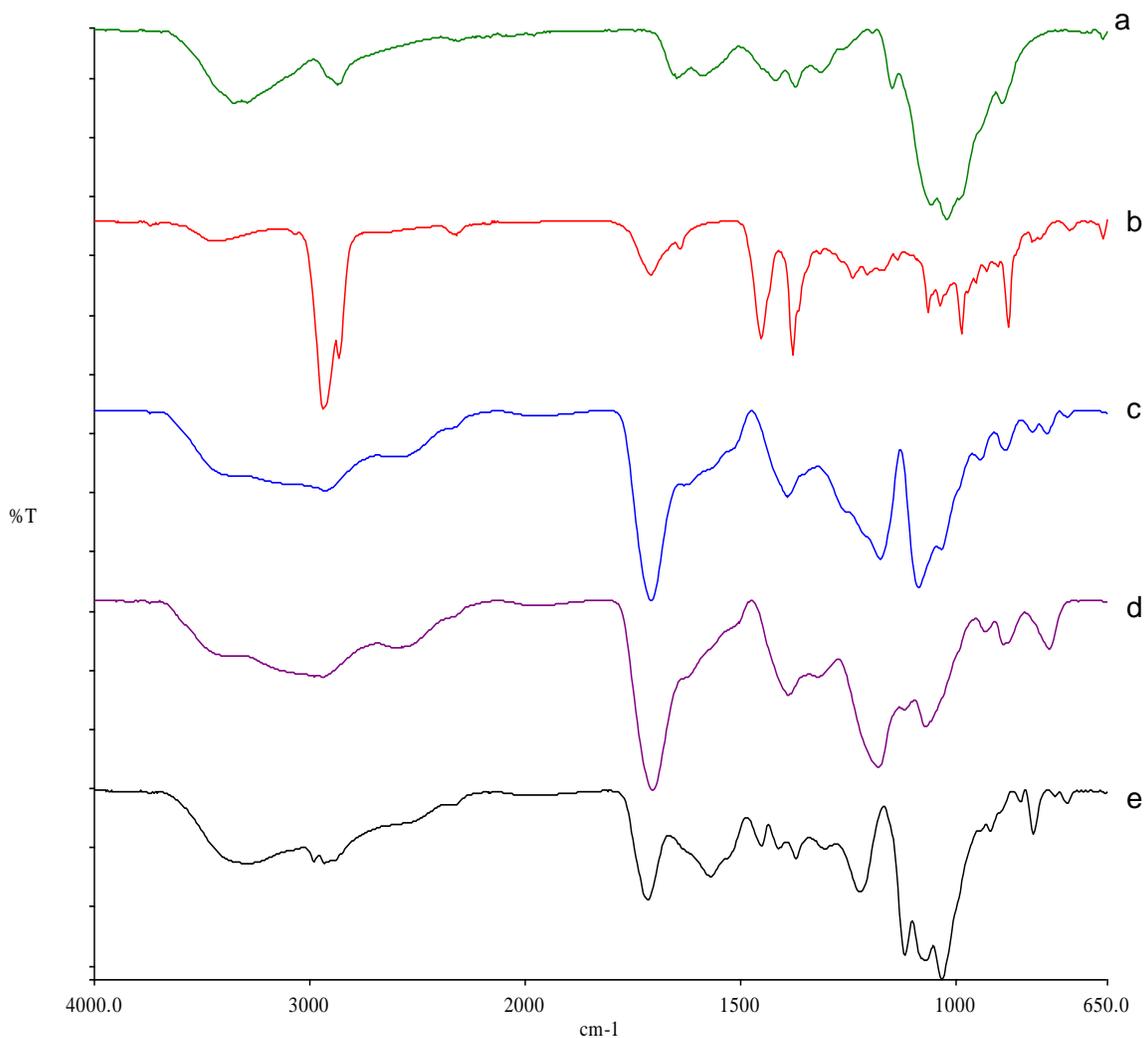
### III.2.2 Caracterización de las películas

Se realizó la espectrometría de infrarrojo ATR-FTIR de las películas obtenidas de QLA, QLG, QLP y QLS (figura 16), con el fin de verificar la modificación del quitosano debida a la síntesis de los materiales. En el espectro 16a, correspondiente al espectro de quitosano se observan las bandas características mencionadas anteriormente. El espectro 16b de la película QLP se observan las bandas principales en  $3446\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo  $-\text{OH}$  relacionado al enlace entre el oxígeno del polietilenglicol y el hidrogeno del quitosano, en  $2869$  y  $2881\text{ cm}^{-1}$  se observan las bandas del grupo CH, cuyas bandas se hacen más pronunciadas debido no solo a los grupos del quitosano sino a los del polietilenglicol,  $1642\text{ cm}^{-1}$  debidas al grupo  $-\text{NH}$  de una amida primaria asociada con los restos del grupo acetoamida después de la desacetilación, en  $1570\text{ cm}^{-1}$  aparece el grupo amino  $-\text{NH}_2$ , la banda en  $1148\text{ cm}^{-1}$  es característica de la tensión asimétrica del grupo C-O-C, las vibraciones del esqueleto propias de la estructura de quitosano aparecen en  $1038$  y  $1067\text{ cm}^{-1}$  (Maza et al., 2007). Además en  $1712$  aparece la banda confirmativa del estiramiento del grupo carbonilo proveniente de la incorporación del ácido láctico (Albertsson et al., 1999; Espadín, 2012).

En los espectros 16c y 16d corresponden a las películas QLA y QLG donde se observan las señales características debidas al quitosano ya descritas, alrededor de los  $1570$  a parecen las bandas de amina primaria, la banda confirmativa del estiramiento del grupo carbonilo del ácido láctico incorporado al quitosano  $1717$  y  $1728\text{ cm}^{-1}$  respectivamente,  $1089$ ,  $1064$  y  $1072$ ,  $1056\text{ cm}^{-1}$  vibraciones del esqueleto de quitosano respectivamente.

Para la película QLS, se observa el espectro 16e la banda correspondiente al grupo OH  $3289\text{ cm}^{-1}$  representa al enlace entre el quitosano y el sorbitol, en  $2982$  y  $2935\text{ cm}^{-1}$  se muestran las bandas del grupo CH correspondientes al quitosano y

al plastificante (sorbitol), en  $1717\text{ cm}^{-1}$  se muestra la banda confirmativa del estiramiento del grupo carbonilo, entre el quitosano y el ácido láctico, en  $1570\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la banda del grupo amina primaria, en  $1472$  corresponde al grupo  $\text{CH}_2$  y en  $1034$  y  $1074\text{ cm}^{-1}$  vibraciones del esqueleto del quitosano.



**Figura 16.** Espectro ATR-FTIR de películas a base de quitosano y plastificantes, quitosano (a), QLP (b), QLA (c), QLG (d) y QLS (e).

### III.2.2.1 Determinación de rendimientos

En la tabla 11 se muestran los rendimientos obtenidos durante la obtención de las películas

Tabla 11. Rendimiento de películas

<b>Clave</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Incorporación de ácido láctico (%)</b>
<b>QLA</b>	48.45 ± 1.1	45.34 ± 0.50
<b>QLG</b>	41.04 ± 0.6	37.00 ± 0.20
<b>QLP</b>	37.88 ± 0.6	57.58 ± 0.82
<b>QLS</b>	26.54 ± 2.07	39.25 ± 0.53

Los resultados son promedios de tres determinaciones y sus desviaciones estándar.

Debido a la dificultad de eliminar el agua en el sistema de reacción, en la etapa de deshidratación para la formación de la amida pueden existir en el producto preparado compuestos como ácido láctico y oligos de ácido láctico sin reaccionar. Por ello una vez terminada la reacción se llevó a cabo la purificación, mediante la precipitación en un antidisolvente (Espadín col., 2014).

La acetona es un compuesto que puede disolver los monómeros y oligómeros sin reaccionar, así el copolímero puede separarse después de la extracción con acetona.

En la tabla 11, se muestran los resultados del rendimiento de cada una de las películas. Espadín col. (2014) obtuvo rendimientos de 22 a 40 %, Sandoval col. (2015) reportó porcentajes de 40 a 58 %, mientras que en este proyecto se tienen rendimientos de 27 a 48 %, observándose que los valores de rendimiento son bajos, sin embargo hay que considerar que no todo el ácido reacciona. En cuanto al porcentaje de incorporación se tienen valores de 37 a 58 %, mientras que los porcentajes de incorporación reportados van de 41 a 57% (Espadín col., 2014), 16 a 43% (Sandoval col., 2015), por lo que los valores adquiridos son

ligeramente superiores a lo reportado, lo que indica que al obtener un mayor porcentaje de incorporación, existe un crecimiento de cadena o una incorporación más homogénea (Espadín col., 2014).

### III.2.2.2 Por ciento de fracción molar (%FM)

A los materiales obtenidos se les determinó el por ciento de fracción molar (%FM) basado en el método del Hirai *et al*, (1991), entre el quitosano y el ácido láctico incorporado mediante espectrometría de  $^1\text{H}$ -RMN considerando las áreas de las bandas características del ácido láctico y las áreas del quitosano.

Alrededor de 2 ppm aparece la primera banda correspondiente a los metilos del N-acilado quitosano, entre 3-3.4 ppm aparece el masivo B, que corresponde a los  $^1\text{H}$  relacionados con los C2 y por ultimo de 3.5-4.2 ppm aparece el masivo A que corresponde a los  $^1\text{H}$  relacionados con los C 3-6 de la molécula. El masivo A y B. La banda principal de  $^1\text{H}$  relacionados al carbono metílico del ácido láctico aparecen de 1.3-1.4 ppm, que es la banda importante para el cálculo de porcentaje de fracción molar (Anexos).

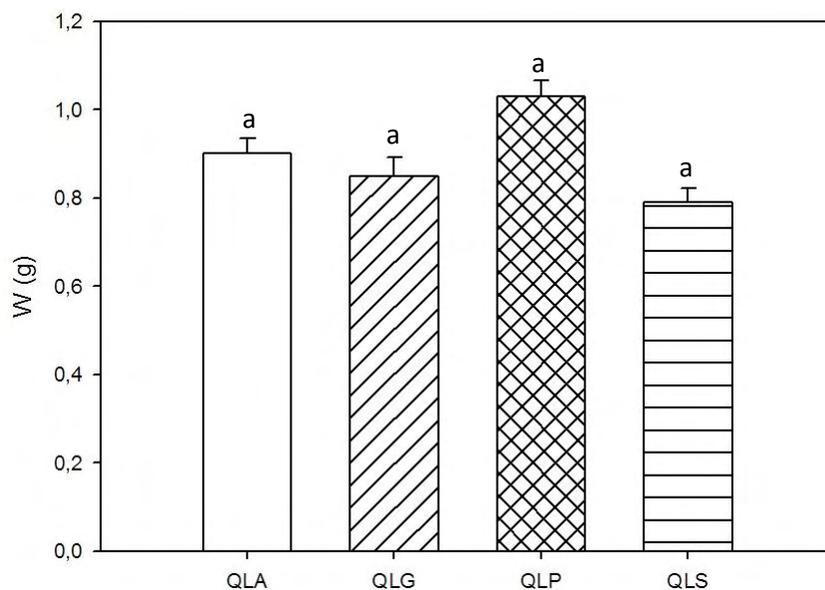
En la tabla 12, Se muestran los resultados del % FM, donde se observa que la película QLA tiene una composición del 73.90% de ácido láctico posterior a QLP (58.36%), QLS (44 %) y QLG con el 35 % de ácido láctico. Estos valores son mayores a los reportados por espadín et al., 2014, con 30.63 % en películas QLA y Sandoval et al., 2015 con 57.21% para películas QLA y 55 % para películas QLS. Por lo que se infiere que al calentar y mantener la temperatura logro su función como catalizador al lograr el entrecruzamiento entre el quitosano y el ácido láctico. Además del calentamiento, los plastificantes también influyen en este entrecruzamiento, ya que el glicerol es más afín al quitosano por lo que este material fue el que presento menor % FM, QLA al no tener plastificante obtuvo la mayor relación molar.

**Tabla 12.** Porcentaje de fracción molar del copolímero quitosano- ácido láctico

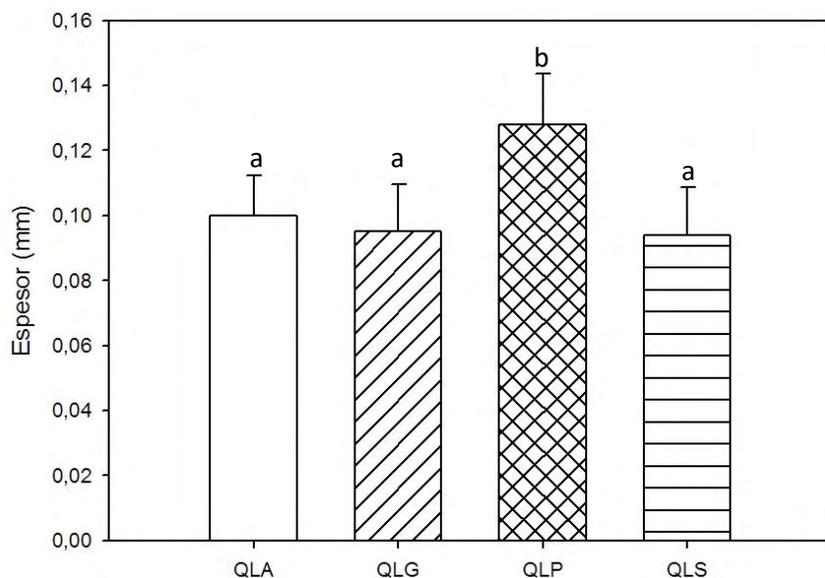
Material	%FM
QLA	73.90
QLG	34.82
QLP	58.36
QLS	44.06

### III.2.2.3 Peso y espesor

En la figura 17 se observa que no hubo diferencia significativa entre los pesos de las películas, siendo la película QLP (1.03 g) con mayor peso, seguida de QLA (0.90 g), QLG (0.85 g) y QLS (0.79 g), Por otro lado en la figura 18 se muestra que hubo diferencia significativa entre los espesores de las películas, teniendo el mayor valor QLP con 0.128 mm, seguida de QLA 0.100 mm, QLG 0.095 mm y QLS 0.094 mm.



**Figura 17.** Peso de películas. Datos promedio de 10 determinaciones. Letras diferente indica diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamientos, utilizando la prueba de Tukey-Kramer



**Figura 18.** Espesor de películas. Datos promedio de 10 determinaciones. Letras diferente indica diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamientos, utilizando la prueba de Tukey-Kramer.

El peso de las películas varió en relación con su composición. Se observó una relación directa entre el peso de las películas y su espesor. Los factores que determinan el espesor de las películas, son la composición de la solución formadora de película, la cantidad de solución añadida a las placas y el área superficial de las mismas, en este trabajo se utilizó la misma cantidad de solución formadora de película para cada tratamiento, así como fueron empleadas las mismas placas, por lo que las variaciones en el espesor de las películas son atribuidas a su composición.

Domínguez (2014) utilizó 20 mL de solución formadora de película de quitosano 1% y ácido láctico obteniendo espesores de 0.077 a 0.082 mm para películas con glicerol al 15% y 0,071 a 0.074 mm para películas con sorbitol al 15%; Villalobos (2015) manejo formulaciones con quitosano al 1%, empleando 30 mL de solución formadora de película, con distintos plastificantes, xilitol con espesor de 0.0711 mm, polietilenglicol con 0.098 mm, Plascencia (2004) reportó un espesor de 0.091mm para películas de quitosano al 1% (p/v) con 17% de sorbitol, dado que en el presente trabajo la concentración de quitosano empleada fue de 1.15% (p/v), se observaron valores muy parecidos. Las películas de este trabajo fueron preparadas siguiendo la metodología reportada por Sandoval *et al.* (2015), reporta

espesores de 0.066 a 0.082 mm. Con base en estos resultados se puede observar una relación entre el peso y los espesores, los principales factores que influyeron en los valores de estos parámetros fue la composición de la solución formadora de película, fueron los plastificantes, la cantidad de solución, ya que a mayor cantidad de solución el espesor será mayor (Trejo, Aragón y Miranda, 2001), además del tipo de secado y la distribución homogénea de la solución.

Lazard y *et al.* (1998) mencionan que para una película resistente generalmente es necesario un espesor mínimo de 0.10 mm aproximadamente. Aunque también se pueden usarse películas finas sobre superficies y entre componentes de alimentos en donde no se requiere a una película resistente. Incluso con un grosor menor a 0.10 mm la película es una barrera temporal eficaz contra la transferencia de agua y gases; los valores que se obtuvieron oscilaron entre 0.094 a 0.128 mm, por lo que las películas obtenidas pueden ser utilizadas en alimentos.

#### III.2.2.4 Color de las películas

**Tabla 13.** Parámetros de color

Material	L*	a*	b*	$\Delta E$	CI
QLA	87.81±0.48 <sup>a</sup>	-0.07±0.12 <sup>b</sup>	5.38±0.01 <sup>a</sup>	15.52±0.05 <sup>a</sup>	-0.11±0.02 <sup>a</sup>
QLG	87.35±0.85 <sup>a</sup>	-0.12±0.06 <sup>b</sup>	4.15±0.07 <sup>a</sup>	15.68±0.03 <sup>a</sup>	-0.25±0.01 <sup>a</sup>
QLP	83.06±0.43 <sup>a</sup>	0.28±0.04 <sup>c</sup>	6.72±0.01 <sup>a</sup>	78.07±0.04 <sup>a</sup>	-1.52±0.04 <sup>a</sup>
QLS	86.82±0.76 <sup>a</sup>	-0.48±0.26 <sup>a</sup>	8.10±0.04 <sup>a</sup>	20.48±0.04 <sup>a</sup>	-0.29±0.07 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de Tukey Kramer

La tabla 13 resume los parámetros de color (L\*, a\*, b\*,  $\Delta E$  y CI) de las películas correspondientes a las películas QLA, QLG, QLP y QLS. Solo en el caso de a\* las películas tuvieron diferencia significativa.

El parámetro L\*: Se puede observar en la tabla 12 que la muestras QLA, QLG son ligeramente superiores a las películas QLP y QLS, siendo los valores cercanos a 100(máxima luminosidad), aunque no presenta diferencia significativa, lo cual es deseable ya que implica que las películas permitieron visualizar el fondo blanco contra el cual fueron apoyadas durante la medición y, por lo tanto, se infiere que

las características visuales de un alimento que haya sido recubierto con estas películas no sufrirá modificaciones.

El parámetro  $a^*$ : En el estudio de este parámetro encontramos que las películas presentaron magnitudes negativas de pequeño módulo. Ello corresponde a una componente de color ligeramente verde no apreciable visualmente. El módulo de  $a^*$  para las películas QLA fue menor que para QLAG seguida de QLP y QLS.

Parámetro  $b^*$ : en todas las películas este parámetro presentó valores entre 5 a 8, indicando un color ligeramente amarillo. Siendo la película QLS la cual presentó un valor mayor que las demás.

El parámetro  $\Delta E$ : El valor de  $\Delta E$  se utiliza para estudiar la similitud de color respecto al patrón (placa blanca). El valor más pequeño (15,52) correspondió a las películas QLA, mostrando así que estas películas fueron las más parecidas al valor patrón.

CI: El índice de color calculado indica que el color de las películas se encuentra en el intervalo entre verde oscuro (-20) y amarillo verdoso (-2). Estos valores están dentro del intervalo de las películas estudiadas por Murillo-Martínez y *et al.* (2010).

En función del análisis realizado respecto al color de las películas, se presenta en la figura 17 marcado con un círculo negro, de manera orientativa, la región de color de las películas estudiadas. Se puede visualizar que el color de las películas se encuentra en un nivel de alta luminosidad y sobre el plano de colores amarillo verdoso.

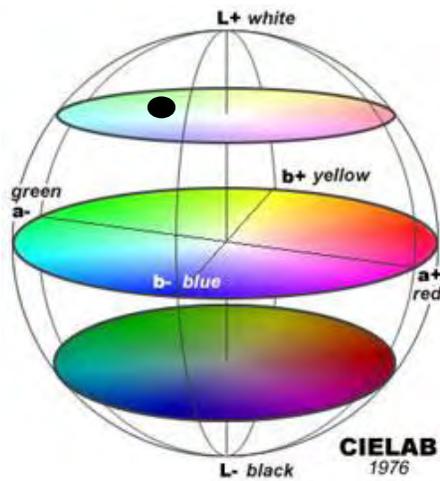


Figura 19 Sistema CIELAB, que representa la escala de colores según los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$

### III.2.2.5 Propiedades ópticas: Transparencia y opacidad

En la figura 20, se observan los espectros de absorbancia entre 200 a 700 nm. En general todas las películas presentaron un máximo de absorbancia a 300 nm, y una tendencia descendente de absorbancia a medida que aumentaba la longitud de onda.

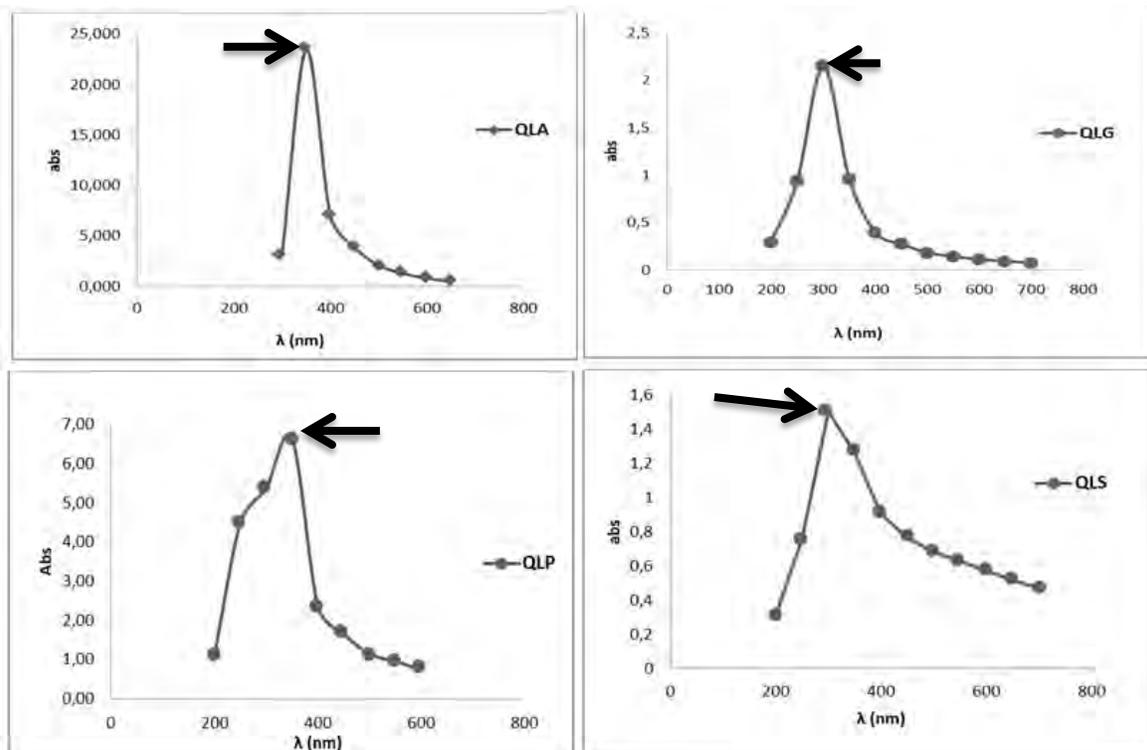


Figura 20 Espectro de absorbancia de las películas QLA, QLG, QLP y QLS. Las flechas indican la máxima absorbancia.

Se observa en la tabla 14 los valores de transparencia, siendo la película QLG 78.26% con mayor porcentaje de transparencia, seguida de QLA con 63.45%, QLS 46.32% y la de menor porcentaje QLP 27.46%, de acuerdo con el análisis estadístico si hubo diferencia significativa entre las películas elaboradas con los diferentes plastificantes (anexos). Domínguez (2014) mostro porcentajes de transparencia para películas de quitosano con glicerol de 85 a 95 %, para xilitol de 89.94 y 92.99% y con sorbitol 88.90 a 90.89 %, Miramont (2012) obtuvo porcentajes de transparencia para películas de quitosano al 1% con glicerol al 10 %, de 72.3%, Villalobos (2015), manejo formulaciones con quitosano al 1% y diferentes plastificantes entre ellos xilitol 78.4% y polietilenglicol de 22.13%. Por lo que las películas formuladas en este trabajo son menos transparentes que las de otros trabajos reportados esto se puede deber a la cantidad de plastificante adicionado y a la forma de secado.

En cuanto a la opacidad se observaron diferencias significativas, la película con mayor opacidad QLP 272,.98  $\mu\text{m} \times \text{nm}$  la menos opaca fue QLG 66.38  $\mu\text{m} \times \text{nm}$ , esto nos confirma lo observado en el parámetro anterior siendo la película QLP la más opaca y la QLG la película más transparente. Ruiz et al. (2016) menciona que la opacidad es un parámetro de perceptibilidad para el ojo humano al aplicar como recubrimiento comestible sobre un alimento, por lo que se vuelve importante determinarla.

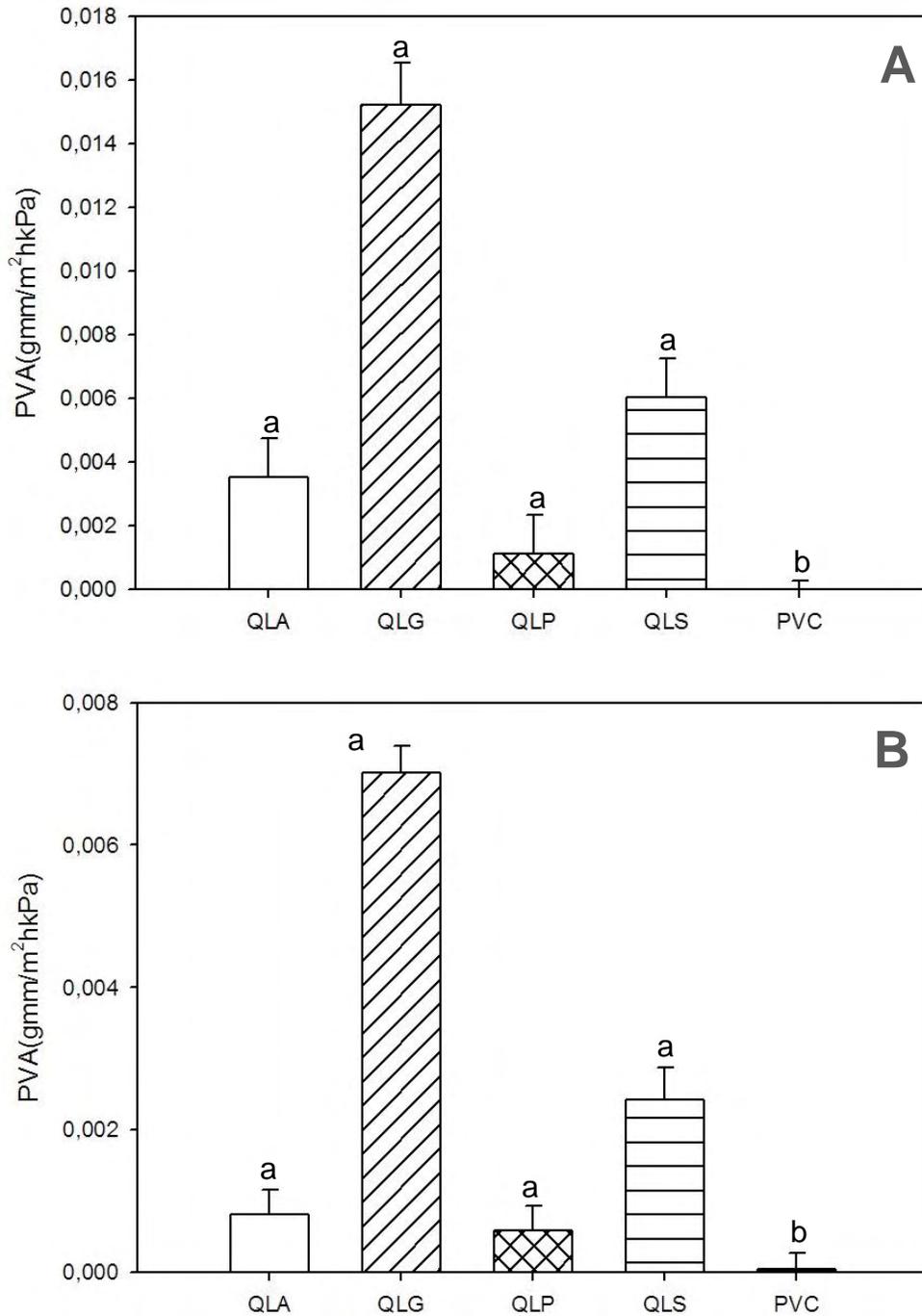
**Tabla 14.** Transparencia y opacidad de películas comestibles

<b>Tratamiento</b>	<b>Transparencia (%)</b>	<b>Opacidad (<math>\mu\text{m} \text{ nm}</math>)</b>
QLA	63.45 <sup>a</sup>	80.40 <sup>a</sup>
QLG	78.26 <sup>a</sup>	66.38 <sup>a</sup>
QLP	7.46 <sup>b</sup>	272.98 <sup>b</sup>
QLS	46.32 <sup>a</sup>	127.24 <sup>c</sup>

Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de Tukey Kramer.

### III.2.2.6 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

En la figura 19 se muestran los resultados de permeabilidad al vapor de agua de las películas QLA, QLG, QLP, QLS y el PVC.



**Figura.21** PVA de las películas, a dos gradientes de HR 78/22 (A) y 22/78 (B) a  $4^\circ\text{C} \pm 2$ . Datos promedio de tres determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamientos, utilizando la prueba de Tukey Kramer.

Se simularon las condiciones de almacenamiento de la carne por lo cual la PVA se midió a 4 °C, con un gradiente 78/22 en donde la HR de la celda de prueba fue de 22% correspondiente a la humedad de la carne dentro del empaque (plato de unigel y PVC), mientras que la HR de la cámara ambiental corresponde a 78% simulando la humedad en el refrigerador, también se llevó a cabo la prueba invirtiendo los gradientes de humedad para observar el comportamiento de las películas.

Para el cálculo de la PVA de películas hidrofóbicas, se conceptuaron 3 etapas: la primera definida a través del índice o coeficiente de difusión en donde el agua es absorbida de la zona de más alta HR externa difundiéndose hacia la película. La segunda sucede al integrarse a esta, generándose una diferencia de presiones parciales en la estructura de la misma (matriz), en donde influye principalmente el grosor y el área de la película. En la tercera fase se da el fenómeno de desorción, considerando el área de la película en donde se presenta la menor HR interna. De tal manera para cada película en particular se tienen diferentes características dependiendo de sus componentes (Trejo, Aragón y Miranda, 2000).

La PVA de las películas analizadas presentan diferencias significativas con respecto al el control PVC (cloruro de polivinilo).Lo que indica que las películas obtenidas son más permeables que el PVC; esto se atribuye a la composición de las películas.

Para ambos gradientes la película QLG presento un valor mayor de PVA, seguida de QLS, QLA y QLP (figura17). Por lo que las películas QLP y QLA son menos permeables. Esto se explica por la estructura del plastificante e interacción polímero-plastificante. Respecto al glicerol, el incremento en la permeabilidad es debido a que el espacio entre cadenas aumenta por la inclusión de moléculas de glicerol entre las cadenas del polímero, lo cual promueve la difusión del vapor de agua a través de las película, por otra parte es importante recordar que las moléculas del glicerol son altamente hidrofílicas, lo cual es favorable a la adsorción y acelera la transmisión del vapor de agua. Además a altas concentraciones de glicerol, éste puede agruparse abriendo la estructura del

polímero, permitiendo la permeabilidad de la película. En cuanto al sorbitol el incremento de permeabilidad se le atribuye a la capacidad del sorbitol para reducir los enlaces de hidrógeno internos, reduciéndose las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero, lo que permite mayor espacio para que las moléculas de agua migren.

En estudios realizados por Zamudio (2008) reporto que el plastificante sorbitol presentaba valores más bajos en cuanto a la PVA que el glicerol, por lo que los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con estos autores, sin embargo en este proyecto se probó otro plastificante (polietilenglicol) el cual mostró ser más impermeable que los otros dos plastificantes, por lo que se puede decir que las películas con polietilenglicol serán más efectivas en la protección como barrera al vapor de agua.

Los factores que afectan la PVA son: efecto del espesor, ya que en las películas poliméricas ideales la permeabilidad a gases o vapor de agua es independiente del espesor del film (Crank, 1975). La mayoría de las películas son de naturaleza hidrofílica y se ha encontrado una relación dependiente entre la permeabilidad al vapor de agua y el espesor de las películas (Park y Chinnan, 1995). McHugh *et al.* (1993) consideran que a medida que el espesor de la película aumenta, se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella, en consecuencia, la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la película se incrementa. Como se puede ver esto concuerda con lo obtenido en este proyecto.

A pesar de que existen en la literatura valores de PVA reportados para películas de quitosano, no son comparables ya que se ha demostrado que la permeabilidad de las películas hidrofílicas está relacionado directamente con el gradiente de HR (Miranda *et al.*, 2003), por lo tanto es necesario que los valores reportados concuerden con las condiciones probadas en este trabajo para poder llevar a cabo una comparación.

### III.2.2.7 Permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono (PO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>)

La tabla 15 muestra, los resultados de permeabilidad al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de las películas. En general las películas son más permeables al dióxido de carbono que al oxígeno, también se observó que el PVC son más impermeables que todas las películas de quitosano más plastificante.

**Tabla 15.** Valores de permeabilidad al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>

Material	PO <sub>2</sub>	PCO <sub>2</sub>
	(gmm/Pam <sup>2</sup> h)	(gmm/Pam <sup>2</sup> h)
PVC	6,14x10 <sup>-10</sup> ± 4.75x10 <sup>-10a</sup>	4,08x10 <sup>-12</sup> ± 1,18x10 <sup>-12a</sup>
QLA	3,25x10 <sup>-9</sup> ± 1.21x10 <sup>-9b</sup>	2.76x10 <sup>-11</sup> ± 5.71x10 <sup>-12b</sup>
QLG	3.53x10 <sup>-8</sup> ± 1.26x10 <sup>-8c</sup>	1.96x10 <sup>-11</sup> ± 8.94x10 <sup>-12b</sup>
QLP	4.14x10 <sup>-8</sup> ± 4.90x10 <sup>-8c</sup>	2.25x10 <sup>-11</sup> ± 2.25x10 <sup>-11b</sup>
QLS	3.03x10 <sup>-9</sup> ± 1.78x10 <sup>-9b</sup>	3.03x10 <sup>-11</sup> ± 2.34x10 <sup>-11b</sup>

Datos promedio de tres determinaciones ± desviación estandar. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de Tukey Kramer.

Las películas QLS y QLA presentaron la mayor permeabilidad al oxígeno, seguidas de QLG y QLP. Mientras que para la PCO<sub>2</sub> las películas QLG y QLP fueron la más impermeables, seguidas de QLA y QLS. Como ya se ha mencionado la adición de plastificantes provoca una disminución de las fuerzas intermoleculares, aumentando así el espacio libre en la matriz polimérica. Por lo tanto, y de igual manera que en la difusión de vapor de agua, la presencia de este tipo de compuestos favorece la difusión del O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Park y Chinan (1995) y Casariego *et al.* (2009) reportan resultados similares en materiales de quitosano.

Generalmente, las películas a base de biopolímeros presentan baja permeabilidad a O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> debido a que estas moléculas son poco solubles en matrices de carácter hidrofílico (polisacáridos y proteínas). Algunos valores de permeabilidad de PO<sub>2</sub> de películas de biopolímeros reportados como el almidón de maíz (3.31x10<sup>-16</sup> gmm/m<sup>2</sup>sPa), goma arábica (5.22x10<sup>-9</sup> gmm/m<sup>2</sup>sPa), metilcelulosa (2.41x10<sup>-9</sup> gmm/m<sup>2</sup>sPa), CMC (5.54x10<sup>-12</sup>), mientras que para materiales sintéticos como celofán (5.22x10<sup>-9</sup> gmm/m<sup>2</sup>sPa), nylon (7.87x10<sup>-14</sup> gmm/m<sup>2</sup>sPa),

polipropileno ( $2.46 \times 10^{-14}$  gmm/m<sup>2</sup>sPa) PVC ( $4.85 \times 10^{-12}$  gmm/m<sup>2</sup>sPa) y el PET ( $3.21 \times 10^{-16}$  gmm/m<sup>2</sup>sPa) (Aguirre, 2011). Comparando estos valores con los valores obtenidos en este trabajo se puede decir que los materiales son parecidos a metilcelulosa, goma arábica, celofán y PVC), por lo que los materiales obtenidos pueden competir con los materiales ya existentes.

### III.2.2.8 Actividad antimicrobiana

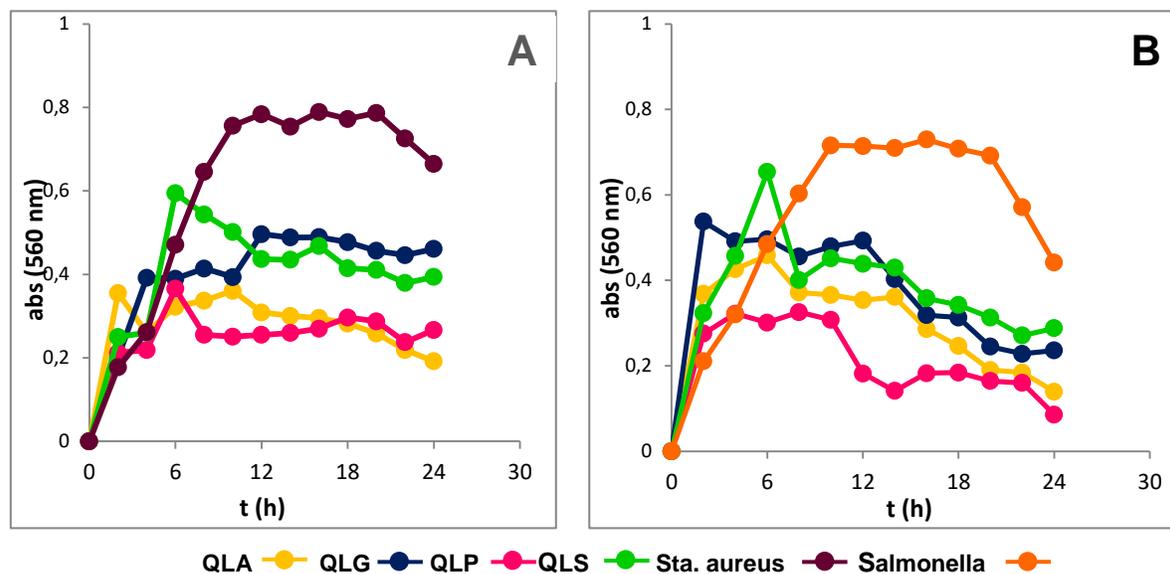


Figura 22. Efecto de inhibición de los materiales a base de quitosano (A) *S. aureus*, (B) *S. typhimurium*.

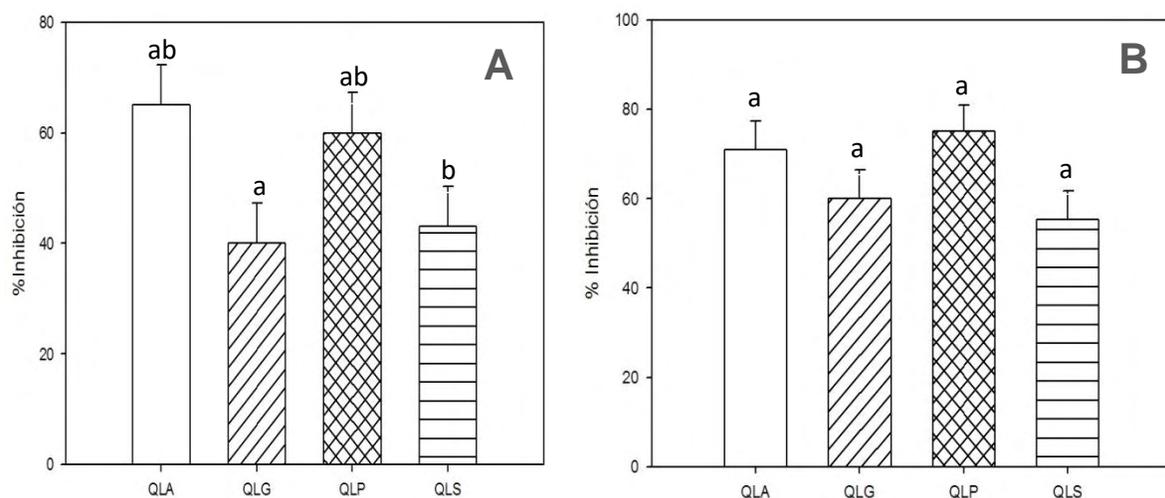


Figura 23. % de inhibición de los materiales a base de quitosano, (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Salmonella typhimurium*. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de Tukey Kramer

Como se observa en la figura 22 el compuesto que causa más inhibición para *Staphylococcus aureus*, es QLA, seguido de QLP, QLS y QLG. Al obtener el porcentaje de inhibición figura 23, se muestra que las películas presentan una diferencia significativa, entre QLP y QLG, el intervalo de inhibición de los materiales es de 43 a 68 %. Para el caso de *Salmonella typhimurium*. La película con mayor inhibición fue QLP, pero al hacer el análisis estadístico se obtuvo que los materiales no presentan diferencia significativa, siendo el intervalo de inhibición para *Salmonella* de 55 a 75 %. Esta inhibición puede deberse a que conforme la bacteria va creciendo y consume los componentes del medio va acidificando ligeramente (pH 5.8) lo que resulta en la protonación de los grupos amino libres que son capaces de interactuar con las cargas negativas de la membrana de la célula microbiana produciendo la liberación de componentes intracelulares (Devlieghere et al, 2004).

En la literatura se ha reportado la evaluación de la actividad de quitosano contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, y *Pseudomonas aeruginosa*) y Gram positivas (*Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Bacillus subtilis*). Los autores reportaron que las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las Gram positivas a diferentes valores de pH (entre 4.5 y 5.9) Jeon et al., 2001.

Chung et al., 2004 también evaluaron el efecto antimicrobiano de quitosano con grado de desacetilación de 15 y 30 % sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. Los autores concluyeron que las bacterias Gram negativas fueron más susceptibles que las bacterias Gram positivas. Lo anterior podría ser debido a la mayor hidrofiliidad de las bacterias Gram negativas, tornándolas más susceptibles al quitosano en medio líquido. Los resultados obtenidos fueron similares a lo reportados por Chung et al., 2004 y Jeon et al., 2001, siendo las bacterias Gram negativas más susceptibles.

La actividad antimicrobiana de quitosano y sus derivados se resumen por la siguiente secuencia de sucesos (1) adsorción del quitosano y/o oligómeros de éste

sobre la superficie de la célula bacteriana, (2) difusión a través de la pared celular e interrupción de la función adecuada de ésta, (3) provocando la interrupción de la membrana citoplasmática, (5) y generando finalmente fugas de los constituyentes citoplásmicos, y (6) la muerte de la célula (Ikeda y Tazuke, 1984; Papineau *et al.*, 1991).

Con base en los resultados obtenidos en la actividad antimicrobiana y PVA se decidió realizar las microscopias, las pruebas mecánicas, y además la aplicación en carne, los materiales con mayor porcentaje de inhibición fueron QLA y QLP, así mismo estos materiales presentan una PVA semipermeable, por lo que los hace favorables para recubrimiento de carne.

### **III.2.2.9 Propiedades Mecánicas**

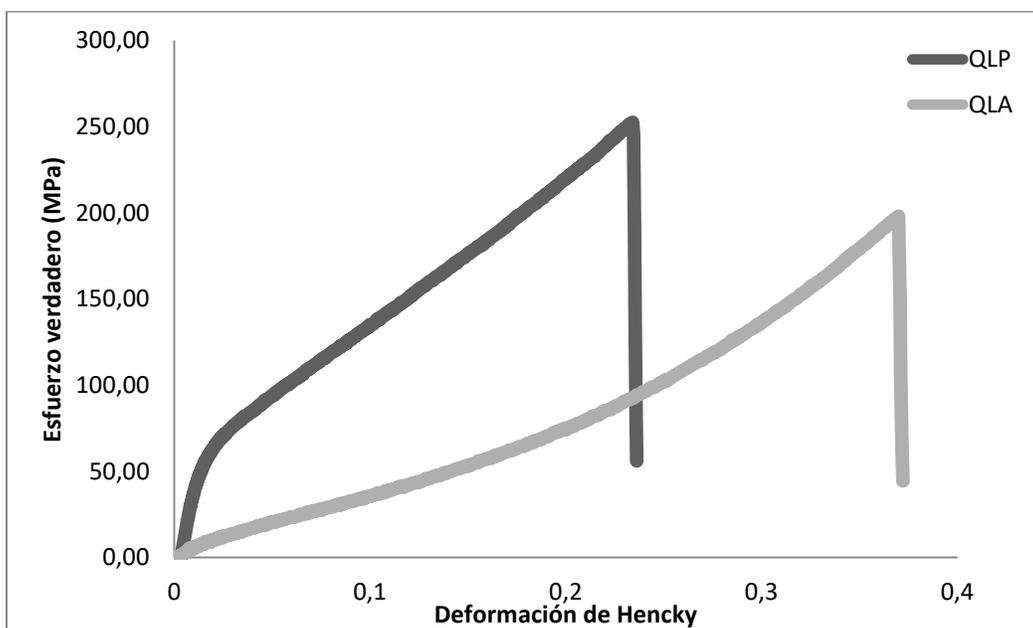
Las películas elaboradas a base de polisacáridos se han reportado en la literatura como frágiles, poco flexibles y quebradizas (Sothornvit & Krochta, 2000), estas características se observan en las películas de quitosano, es por ello que en el presente trabajo se funcionalizan con ácido láctico y diferentes plastificantes para formar materiales con mejores propiedades mecánicas.

Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas se muestran en la tabla 16 y 17. Estas describen el modo en que el material responde a la aplicación de una fuerza o carga y son tres: el módulo de Young o módulo elástico es una medida de la rigidez de la película, cuanto menor es el módulo mayor es su cambio de longitud (deformación) con respecto a la fuerza aplicada, es decir, menor es su elongación por lo tanto el material es más rígido. El esfuerzo máximo, indica la máxima fuerza que la película puede resistir al ser alargada hasta el momento de su fractura. Finalmente la elongación (E%), corresponde al cambio máximo de longitud que sufre la película antes de ser fracturada (Khoshgozaran-Abras *et al.*, 2012; Groover, 1997).

**Tabla 16.** Propiedades mecánicas de fuerza de fractura en la Extensión

Muestra	Módulo de Young (MPa)	Elongación (%)	Esfuerzo máximo (MPa)
QLA	461.7± 29.6	89.5± 10.8	191.0 ± 6.2
QLP	853.5 ± 15.7	59.5 ± 4.7	251.8± 15.8

Como se observa en la tabla 15 la película más elástica es QLP (853.5 MPa) la cual necesita un esfuerzo de 251.8 MPa para romperse y se extendió un 59.5%, en el caso de la película QLA es más rígida ya que el módulo de Young es menor (461.7 MPa), el esfuerzo que necesita para romperse es de 191.0 MPa y se estira un 89.5 % figura 20, en el caso de la película QLP presento valores mayores en los parámetros analizados por tener un mayor porcentaje de incorporación (57.58%), comparado con el de la película QLA (45.34 %), al haber un mayor porcentaje de incorporación se mejora el grado de entrecruzamiento físico de las cadenas a través de la agregación de cadenas laterales hidrófobas lo que conduciría a una disminución correspondiente de la movilidad de la cadena del quitosano aumentando la resistencia a la extensión (Espadín et al., 2014).



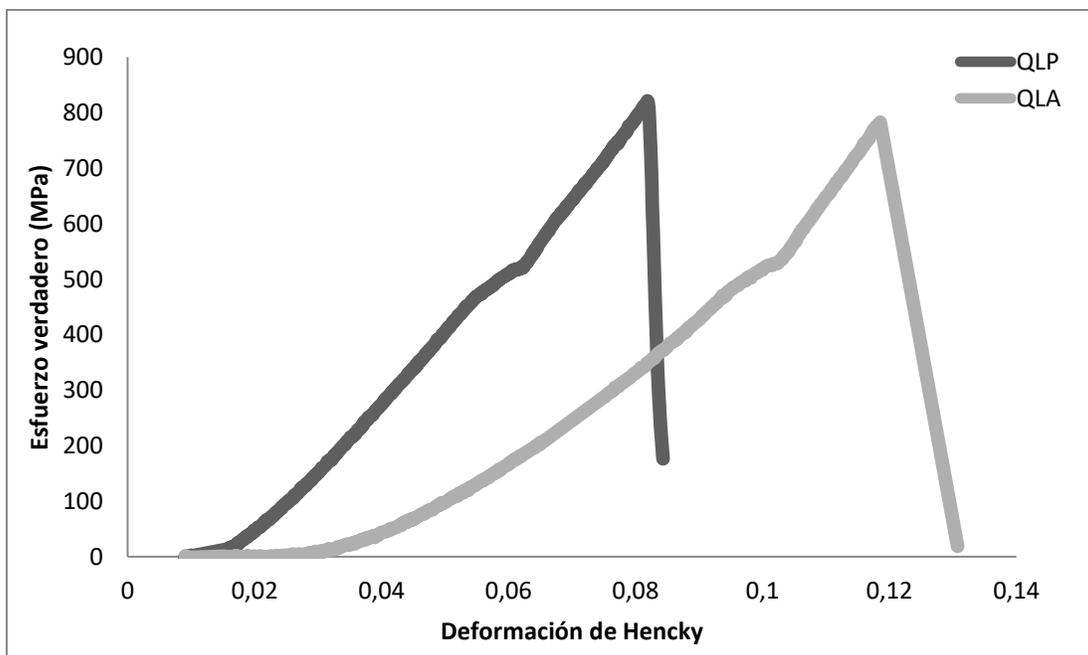
**Figura 24.** Perfil de fuerza en la fractura en la extensión

Los valores de las propiedades mecánicas de cada película fueron en ambos casos mayores comparados con valores de formulaciones de películas de quitosano reportados por Zamudio (2008), las cuales tenían un módulo de Young entre 100 y 120 MPa y un esfuerzo máximo entre los 62 y 27 MPa. Corona (2011), reporto que el módulo de Young para películas de quitosano fue de 233 y para películas quitosano-co-cítrico con 10% de sorbitol fue de 433 MPa. Espadín et al., (2014) reporto un módulo de Young de 476.3 MPa y 482.0 MPa para películas QAL y QPAL respectivamente, estos valores son menores a los obtenidos con las películas de este trabajo, lo que indica que estas son más elásticas y requieren un esfuerzo mayor para romperse, además de que se estiran más.

Estos mismas películas fueron sometidos a una prueba de punción en la que los perfiles de cada una se observan en la Figura 21 y las propiedades mecánicas en la Tabla 16.

**Tabla 17.** Propiedades mecánicas de fuerza de fractura en punción.

<b>Muestra</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Elongación (%)</b>	<b>Esfuerzo máximo (MPa)</b>
<b>QLA</b>	11156.6 ± 66	50.8 ± 2.9	816.8 ± 27.6
<b>QLP</b>	42428.5 ± 45	64.5 ± 18.7	900.2 ± 16.2



**Figura 25.** Perfil de fuerza en la fractura en la punción

En esta prueba las películas muestran resultados similares en cuanto al orden de mayor a menor módulo de elasticidad, siendo QLP la película más elástica y QLA la película más rígida. Como se mencionó, el valor del módulo va relacionado con un mayor porcentaje de incorporación. Sin embargo estos resultados son más altos a los reportados en la extensión lo que podría deberse al área donde se aplica la fuerza que ahora es mayor, sin embargo estos valores son mayores a los reportados por Espadín et al., (2014), Sandoval (2014), y por Corona (2011).

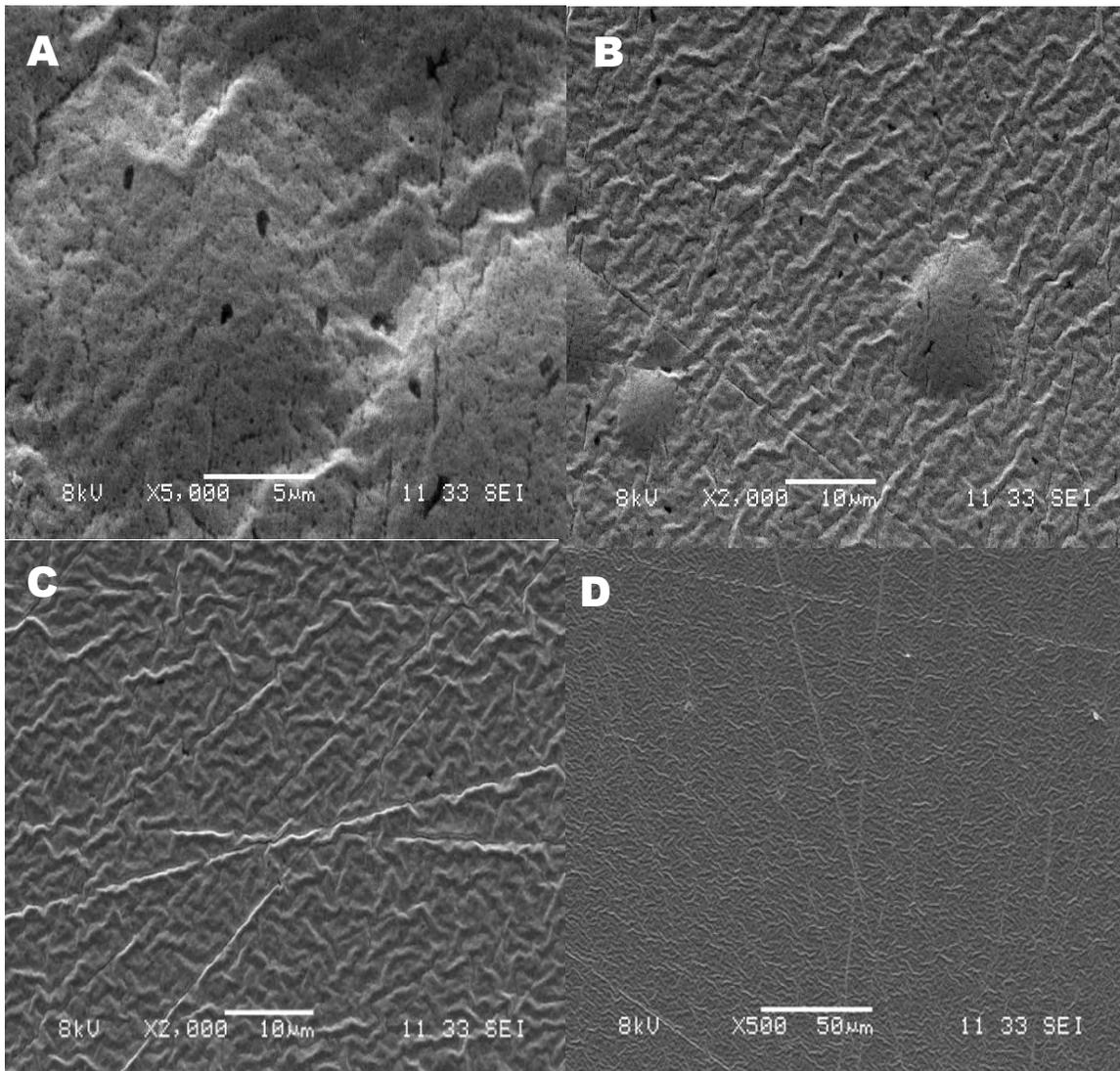
Es posible asumir que la presencia del plastificante modificó las propiedades de las películas obtenidas, mediante el reacomodo de las interacciones entre las moléculas del biopolímero y del plastificante durante la formación de la película dando como resultado un incremento en las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación en la prueba de extensión y punción (Plascencia, 2004). Además se ha observado que las propiedades mecánicas en películas de quitosano, se ven afectadas por la fuente de obtención de quitina, el grado de acetilación y peso molecular del quitosano, así como, por el tipo de solución ácida empleada para disolverlo (Khoshgozaran-Abras *et al.*, 2012). El arreglo intermolecular del quitosano en solución está influenciado por las peculiaridades de la solución ácida

empleada, tal como, su fuerza iónica y su grado de disociación. Park *et al.* (2002), realizaron un estudio empleando distintos ácidos orgánicos como disolventes, obtuvieron valores de elongación en orden ascendente para las películas obtenidas con ácido acético, ácido láctico; es decir, las películas obtenidas al disolver el quitosano en ácido láctico, presentaron valores mayores de elongación, la película fue más flexible, mientras las obtenidas con ácido acético mostraron menores valores de elongación, es decir las películas resultaron más rígidas; por lo tanto el plastificante y el disolvente afecta las propiedades mecánicas.

Por otro lado, el LDPE posee un módulo de Young de 150 MPa, el HDPE de 700 MPa, el cloruro de polivinilo de 1050 MPa y el polipropileno de 1400 MPa (Groover, 1997), comparando estos valores con los obtenidos en el presente trabajo, podemos destacar su potencial aplicación como envase de alimentos.

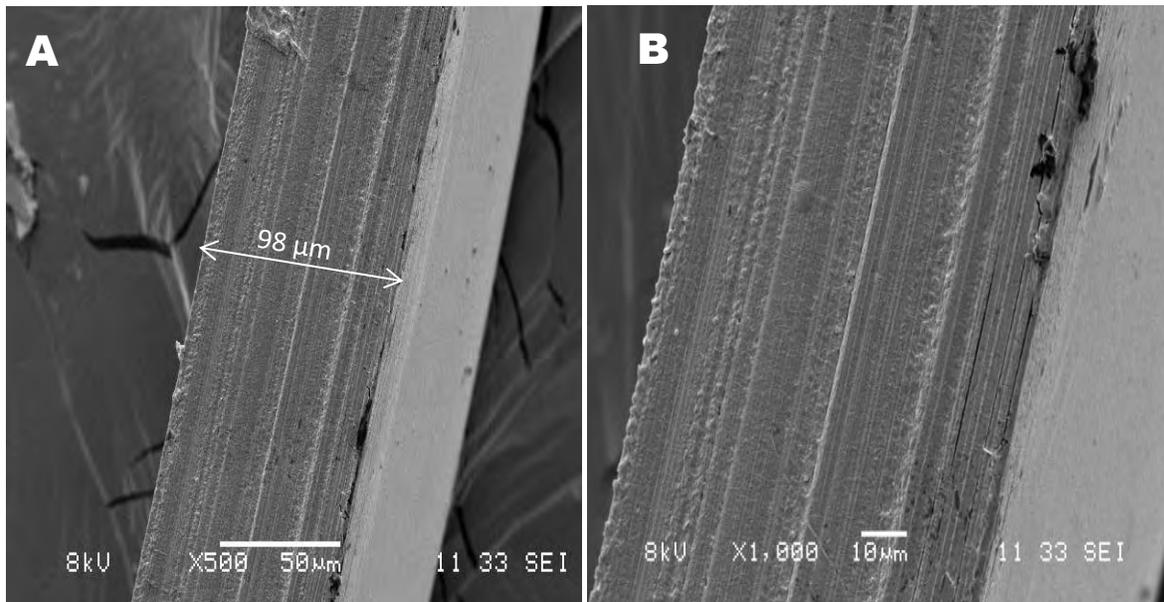
#### **III.2.2.9 Microscopía electrónica de barrido**

La estructura final del recubrimiento esta influenciada por la distribución de los diferentes componentes de la película, la interacción entre ellos y las condiciones durante el secado (Vargas et al., 2009). La figura 26 se muestra las micrografías obtenidas de la SEM de la película QLA, al frente (A y B), se observa que la superficie es homogénea, rugosa y con poros de 250 y 376 nm observados a un aumento de  $\times 5,000$  y  $\times 2,000$ , esto se debe a la ruptura de burbujas durante el proceso de secado, tal como ha sido observado en estudios previos (Hernandez., 2014). En las figura (C y D) se muestra la parte del reverso de la película, donde se ve una superficie homogénea, continua y rugosa.



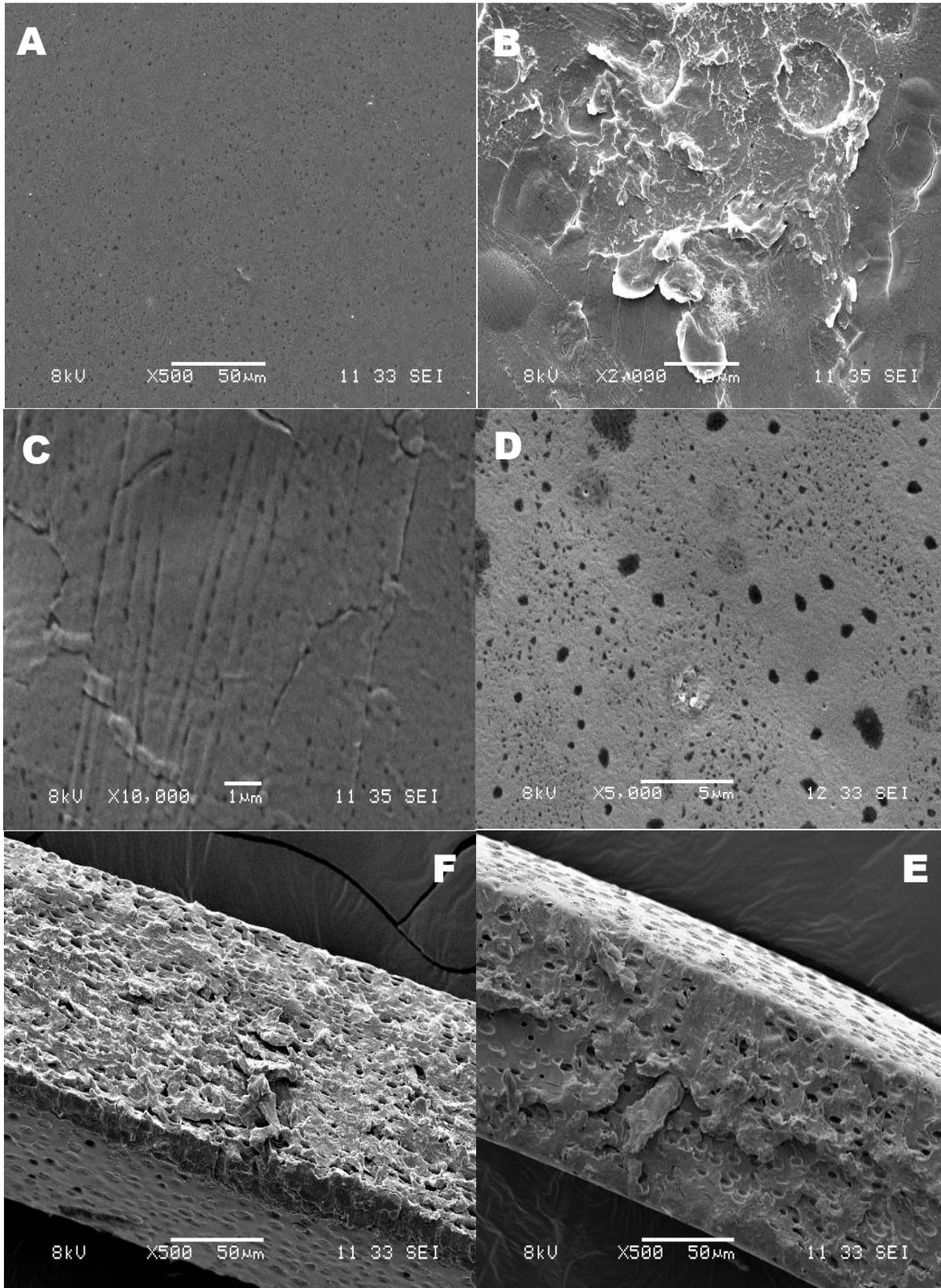
**Figura 26.** Micrografías de la película QLA, donde A y B frente; C y D reverso

En las microscopías de corte transversal (figura 27), se observa varias líneas o capas que indica que el secado fue paulatino además de ser homogéneo, así mismo se puede medir el espesor el cual es de 98 μm que es equivalente a 0.098 mm



**Figura 27.** Micrografía de corte transversal de la película QLA, A y B con aumento de X500 y x1, 0000 respectivamente

En la figura 28 corresponde a las micrografías de la película QLP, se observa la parte frontal de la película (figura 28 A ) que es lisa con unas partes grumosas y varios poros en la figura 28B se ve una zona aglomerada en la cual se puede deber a que no hubo una homogenización en los componentes de la película. En el reverso de la película (28 C y D) se observa una superficie fibrosa, con grietas y poros, los cuales tienen una medida promedio de 360 y 476 nm en ambas caras, coherente con lo observado en Pinotti et al., 2007. En cuanto al corte transversal (28 E y F), se observan las aglomeraciones lo que confirma lo visto en la figura 27 B, que no hubo una correcta homogenización, así mismo se ve que hay varios poros.



**Figura 28.** Microscopias de la película QLP, frontal (A y B) reverso (C y D) y corte transversal (E y F)

### **III.3 Etapa III. Evaluación de películas como envase y efecto inhibidor contra *S. typhimurium* y *S. aureus* en carne (molida) de bovino**

Las muestras de carne molida fueron pesadas cada 72 h, durante 15 días de almacenamiento con el fin de determinar el color, índice de rancidez, porcentaje de pérdida de peso relativa (RWL), humedad, pH, acidez total titulable y análisis microbiológico, utilizando las películas QLA y QLP.

#### **III.3.1 Pérdida de peso relativa (RWL) y Humedad**

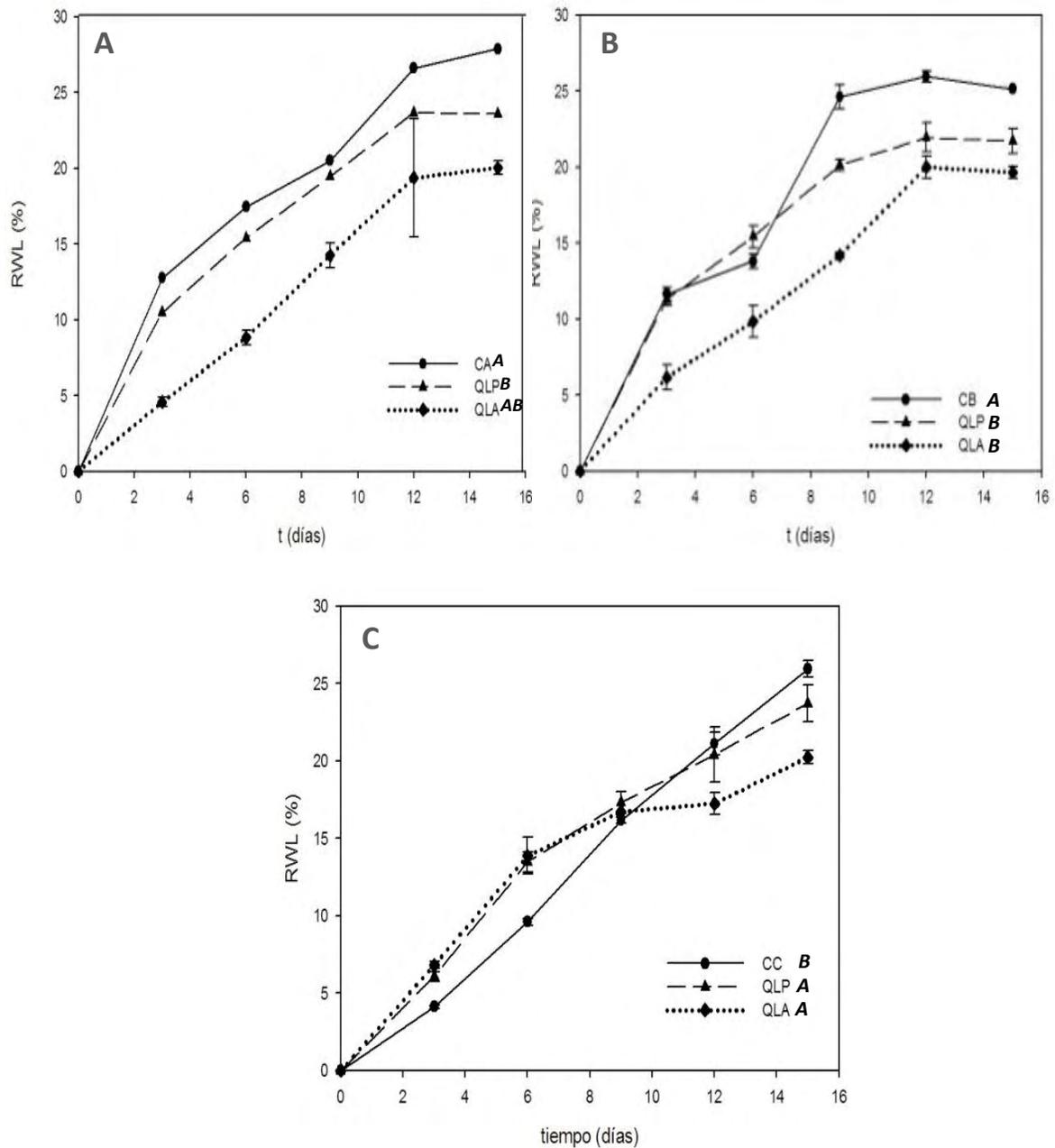
Se puede observar que la carne no inoculada e inoculada no presentó diferencia significativa, entre tratamiento figura 29, el tratamiento que presentó una menor pérdida de peso para carne no inoculada como inoculada con *S. aureus* y *S. typhimurium* fue la muestra recubierta con la película QLA (20.04, 20,23 y 19.66%).

En la Figura 30 se observa que en la carne no inoculados hubo diferencia significativa entre tratamientos, El porcentaje de pérdida de humedad de las muestras variaron según la composición de la película y de si esta inoculada o no la carne, los plastificantes actuaron como agente hidrofóbico.

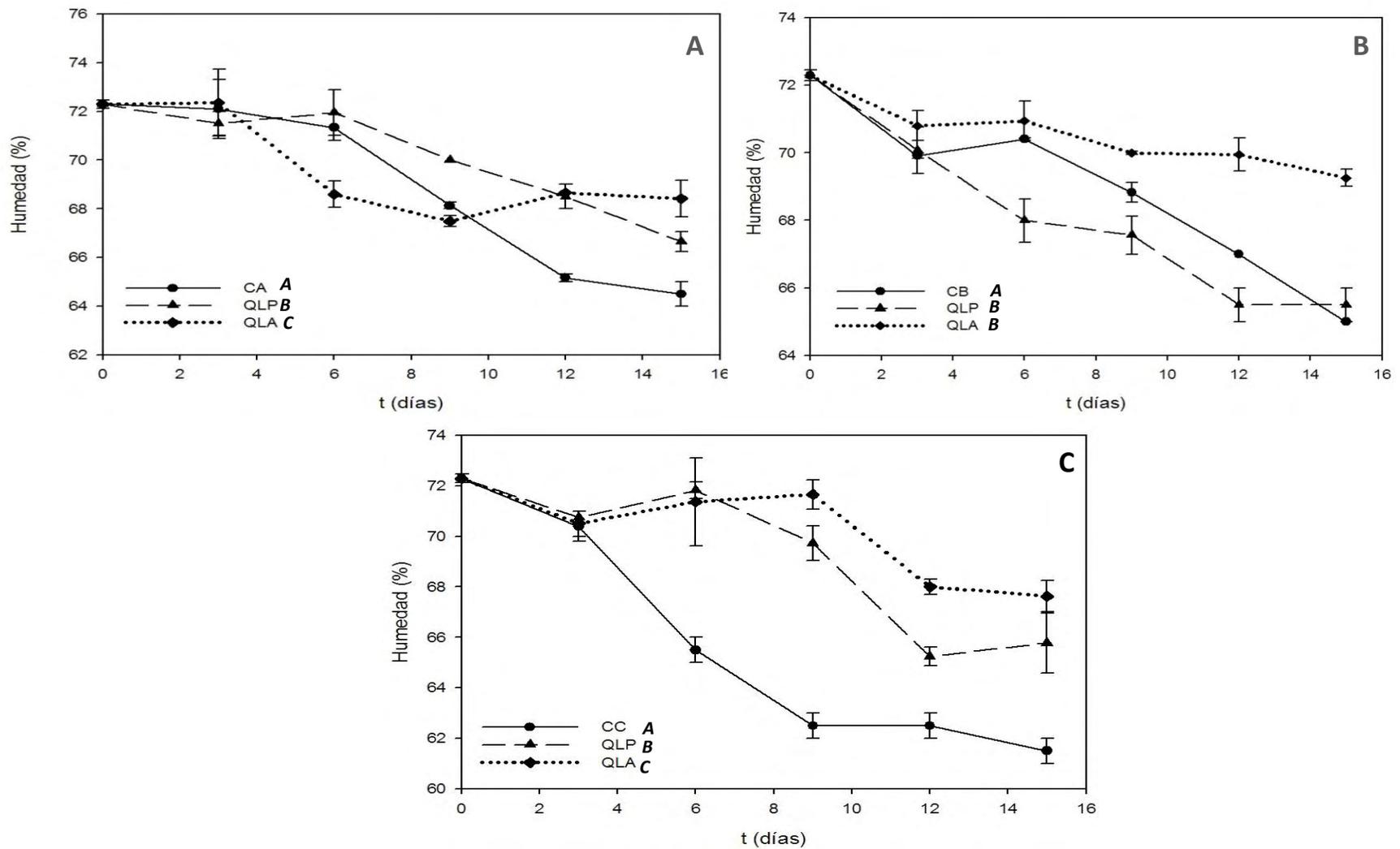
Las muestras de carne que no estuvieron recubiertas por las películas, tuvieron mayor pérdida de humedad que aquellas que si estuvieron recubiertas. Las muestras que estaban sin inocular y recubiertas por la película QLA fueron las que presentaron la menor pérdida de humedad, para la carne inoculada con *S. aureus* QLA fue la que presento menor perdida de humedad, mientras que las inoculadas con *S. typhimurium* presentaron diferencia significativa, siendo QLP la película con menor pérdida de humedad. Por lo que hay una relación entre RWL, % humedad y la PVA.

La PVA de las películas, tienen un efecto importante sobre estos parámetros ya que a mayor PVA la RWL será mayor, por lo tanto la perdida de humedad también será mayor aunque en este trabajo se esperaba que así fuera, se observó lo contrario siendo que la película QLA con  $3.5 \times 10^{-3}$  gmm/m<sup>2</sup> hkPa y QLP con  $1.09 \times 10^{-3}$  g mm/ m<sup>2</sup> h kPa fue la que presento mejores características en estos

parámetros, se puede explicar por los poros que presenta la película QLP observadas en las microscopias que hacen que la película QLP tuviera una mayor pérdida relativa de peso.



**Figura 29** Pérdida relativa de peso (RWL) de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con *S. aureus*, (B) y *S. typhimurium* (C) a 4 °C y 78% HR. Datos promedio de 3 determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de Tukey Kramer.



**Figura 30** Humedad (%) de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con *S. aureus*, (B) y *S. typhimurium* (C) a 4 °C y 78% HR. Datos promedio de 3 determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de Tukey Kramer.

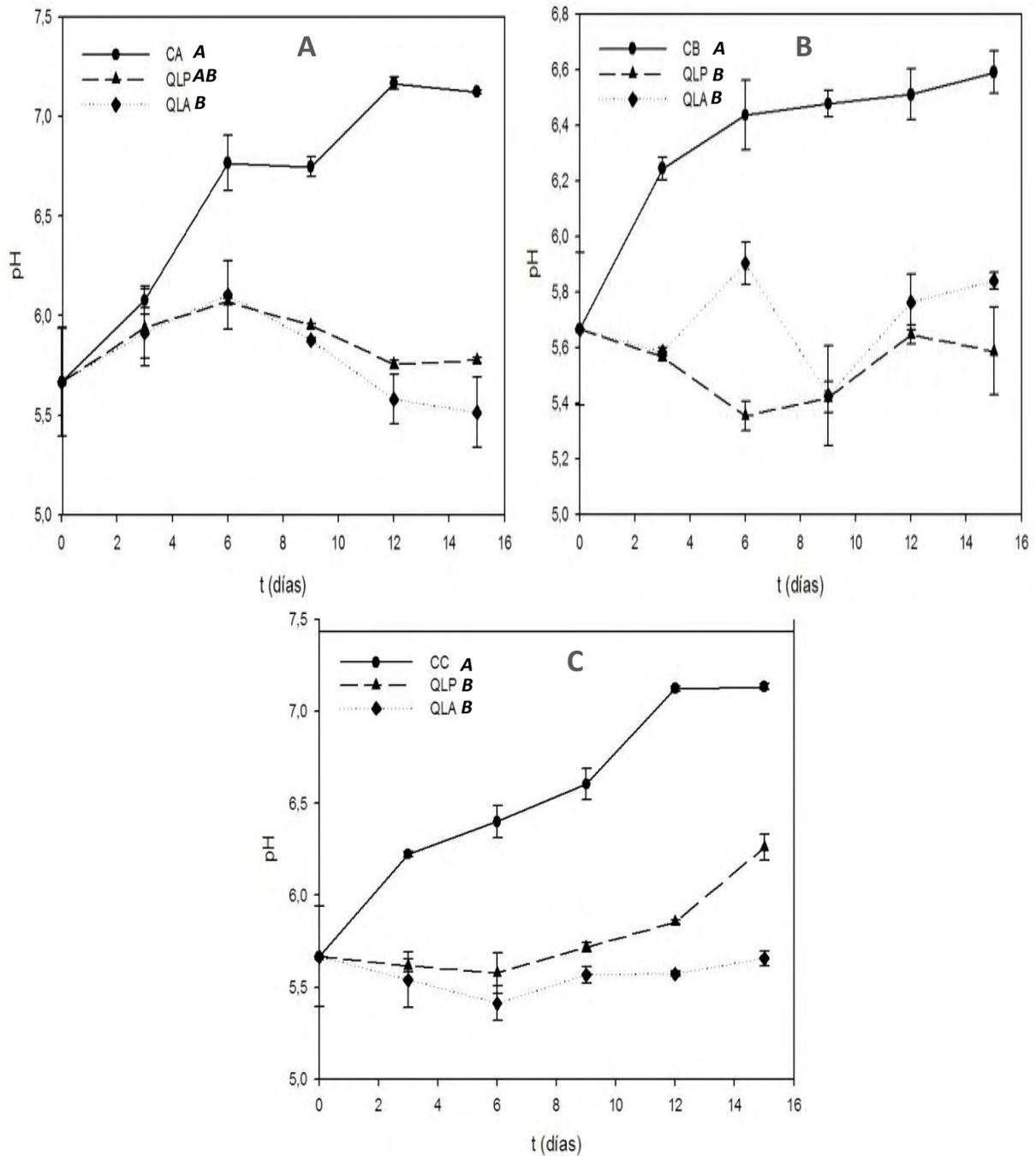
### III.3.2 pH y Acidez total titulable (ATT%)

Los resultados obtenidos de pH se muestran en la figura 31, se puede observar que hubo diferencia significativa entre los tratamientos (Anexos) para la carne inoculada con *S. aureus*, *S. typhimurium* y carne sin inocular, los tratamientos mostraron un descenso en el pH, siendo a partir del día nueve un cambio considerable, teniendo un pH final de 4.5 para QLA y 5.12 para QLP para carne sin inocular, en el caso de las muestras inoculadas también hubo un descenso de pH, existiendo un menor pH para la carne inoculada con *S. typhimurium* con pHs finales de 5.3 y 4.3 para QLP y QLA respectivamente. Esta disminución de pH se puede atribuir a la difusión del ácido láctico en la carne siendo más soluble en los días finales del almacenamiento, ya que las películas comenzaban a disolverse en la carne, otra posible explicación es el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Mientras que para el control se observó un aumento de pH esto se puede deber a que hubo crecimiento microbiano y por lo tanto a la liberación de componentes alcalinos generados durante la degradación proteica.

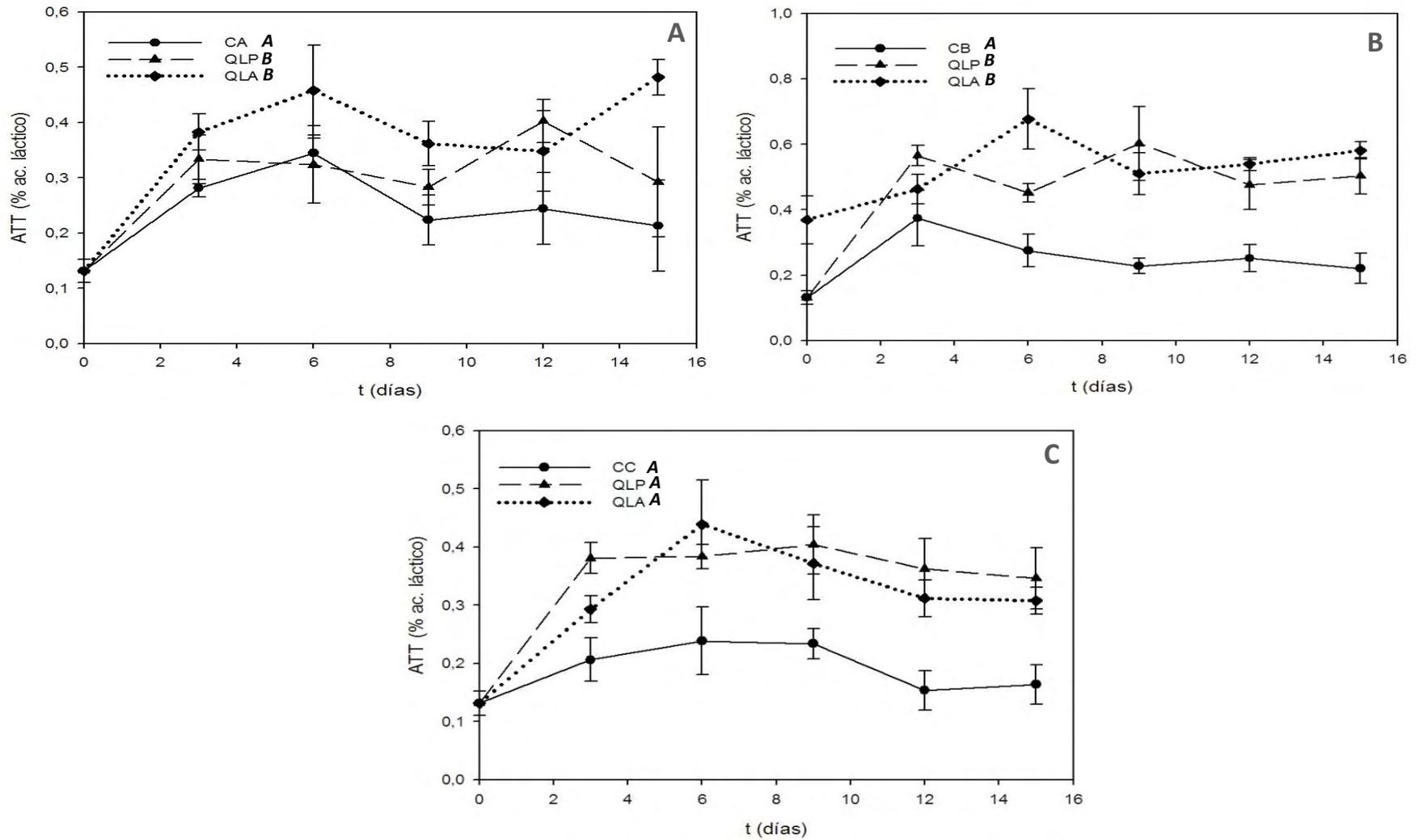
Bonilla et al., 2014 y Alnoman et al., 2017 reportaron el pH de carne de cerdo y pollo respectivamente, recubierto con películas de quitosano y ácido acético 1% y aceites esenciales, mostrando valores de pH menores al final de del almacenamiento comparados con el control. El pH del control aumentó durante el almacenamiento y el pH de la carne disminuyó a los tres días de almacenamiento para el caso de la carne de cerdo, para el pollo el pH disminuyó al segundo día. En este trabajo a diferencia de los trabajos citados se trabajó con plastificantes y ácido láctico, siendo este último el que pudo disminuir el pH ligeramente.

En cuanto a la acidez total titulable se incrementó durante el almacenamiento, en todos los tratamientos, pero más marcado en las muestras de carne inoculadas, para *S. typhimurium* se observó al tercer y cuarto día, 0.4 y 0.5% respectivamente para la película QLP, para *S. aureus* el incremento se dio al sexto día para QLA (0,8%) y en el noveno día para QLP (0.6%), posteriormente se ve una disminución del porcentaje de ATT, Aunque no son aumentos muy significativos; estos valores de ATT son atribuidos a la migración de ácido láctico a la carne, pero también al

crecimiento de bacterias ácido lácticas. El análisis estadístico no mostro una diferencia significativa figura 32.



**Figura 31.** pH de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con *S. aureus*, (B) y *S. typhimurium* (C) a 4 °C y 78% HR. Datos promedio de 3 determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de de Tukey Krame



**Figura 32** ATT (% ác. Láctico) de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con *S. aureus*, (B) y *S. typhimurium* (C) a 4 °C y 78% HR. Datos promedio de 3 determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de de Tukey Kramer

### III.3.3 Color

Las tabla 18, 19 y 20 resumen los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y CI) de carne inoculada y sin inocular, presentaron diferencia significativa entre el control y la películas (QLA y QLP) en el tratamiento sin inocular, en los otros tratamientos inoculados con *S. aureus* y *S. typhimurium*, si presentaron diferencia significativa entre las películas utilizadas.

**Tabla 18.** Parámetros de color para carne sin inocular

Material	t (días)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	IC
<b>Control<sup>A</sup></b>	3	44.21±0.02 <sup>a</sup>	8.67±0.03 <sup>a</sup>	8.21±0.03 <sup>a</sup>	24.66±0.04 <sup>a</sup>
	6	40.66±0.01 <sup>a</sup>	15.12±0.05 <sup>a</sup>	6.23±0.03 <sup>a</sup>	61.63±0.01 <sup>b</sup>
	9	27.22±0.02 <sup>b</sup>	22.09±0.04 <sup>a</sup>	9.05±0.02 <sup>a</sup>	28.11±0.04 <sup>a</sup>
	12	17.22±0.03 <sup>b</sup>	12.53±0.04 <sup>a</sup>	6.18±0.04 <sup>a</sup>	40.92±0.03 <sup>a</sup>
	15	16.09±0.03 <sup>b</sup>	8.22±0.03 <sup>a</sup>	3.55±0.02 <sup>a</sup>	76.44±0.03 <sup>b</sup>
<b>QLP<sup>B</sup></b>	3	48.86±0.03 <sup>a</sup>	4.85±0.03 <sup>a</sup>	3.28±0.05 <sup>a</sup>	47.97±0.05 <sup>a</sup>
	6	37.69±0.04 <sup>a</sup>	9.79±0.06 <sup>a</sup>	21.70±0.05 <sup>a</sup>	25.34±0.05 <sup>a</sup>
	9	32.66±0.05 <sup>b</sup>	19.45±0.07 <sup>a</sup>	12.23±0.06 <sup>a</sup>	18.63±0.03 <sup>a</sup>
	12	31.41±0.03 <sup>a</sup>	9.79±0.08 <sup>a</sup>	5.38±0.02 <sup>a</sup>	48.07±0.07 <sup>a</sup>
	15	30.95±0.03 <sup>a</sup>	32.79±0.03 <sup>b</sup>	7.82±0.03 <sup>a</sup>	162.11±0.06
<b>QLA<sup>B</sup></b>	3	41.79±0.06 <sup>a</sup>	9.29±0.03 <sup>a</sup>	7.67±0.03 <sup>a</sup>	29.18±0.01 <sup>a</sup>
	6	38.07±0.04 <sup>a</sup>	12.04±0.04 <sup>a</sup>	5.29±0.02 <sup>a</sup>	65.19±0.02 <sup>b</sup>
	9	38.23±0.05 <sup>b</sup>	14.94±0.01 <sup>a</sup>	14.99±0.03 <sup>a</sup>	15.60±0.03 <sup>a</sup>
	12	50.00±0.03 <sup>a</sup>	9.11±0.02 <sup>a</sup>	8.02±0.03 <sup>a</sup>	22.75±0.02 <sup>a</sup>
	15	37.28±0.02 <sup>a</sup>	6.36±0.03 <sup>a</sup>	3.19±0.02 <sup>a</sup>	56.36±0.01 <sup>b</sup>

**Tabla 19.** Parámetros de Color para carne inoculada con *Staphylococcus aureus*

<b>Material</b>	<b>t(día)</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>IC</b>
<b>Control <sup>A</sup></b>	3	43.16±0.01 <sup>a</sup>	10.10±0.03 <sup>a</sup>	4.09±0,01 <sup>a</sup>	62.00±0,02 <sup>a</sup>
	6	46.99±0.02 <sup>a</sup>	9.76±0.02 <sup>a</sup>	3.73±0,01 <sup>a</sup>	57.29±0,01 <sup>a</sup>
	9	40.41±0.03 <sup>a</sup>	5.48±0.03 <sup>a</sup>	14.97±0,03 <sup>a</sup>	4.58±0,03 <sup>b</sup>
	12	27.44±0.04 <sup>b</sup>	10.50±0.06 <sup>a</sup>	5.51±0,02 <sup>a</sup>	33.20±0,02 <sup>a</sup>
	15	15.31±0.2 <sup>b</sup>	6.29±0.05 <sup>a</sup>	5.60±0,03 <sup>a</sup>	26.70±0,04 <sup>a</sup>
<b>QLP <sup>B</sup></b>	3	53.62±0.06 <sup>a</sup>	6.53±0.03 <sup>a</sup>	3.23±0,02 <sup>a</sup>	89.08±0,01 <sup>a</sup>
	6	46.99±0.03 <sup>a</sup>	9.76±0.04 <sup>a</sup>	3.73±0,03 <sup>a</sup>	57.29±0,03 <sup>a</sup>
	9	40.41±0.04 <sup>b</sup>	5.48±0.04 <sup>a</sup>	14.97±0,04 <sup>a</sup>	4.58±0,01 <sup>b</sup>
	12	46.07±0.01 <sup>a</sup>	17.03±0.03 <sup>a</sup>	8.36±0,02	37.21±0,01 <sup>a</sup>
	15	37.42±0.02 <sup>a</sup>	12.07±0.04 <sup>a</sup>	4.16±0,02 <sup>a</sup>	77.68±0,02 <sup>a</sup>
<b>QLA <sup>C</sup></b>	3	33.46±0.01 <sup>a</sup>	10.32±0.03 <sup>a</sup>	6.74±0.04 <sup>a</sup>	46.44±0.03 <sup>a</sup>
	6	35.02±0.03 <sup>a</sup>	8.05±0.06 <sup>a</sup>	5.85±0.02 <sup>a</sup>	55.01±0.06 <sup>a</sup>
	9	47.54±0.03 <sup>a</sup>	12.97±0.06 <sup>a</sup>	13.64±0.02 <sup>a</sup>	14.23±0.04 <sup>b</sup>
	12	43.75±0.01 <sup>a</sup>	14.13±0.04 <sup>a</sup>	5.67±0.04 <sup>a</sup>	57.70±0.02 <sup>a</sup>
	15	28.43±0.03 <sup>a</sup>	10.58±0.05 <sup>a</sup>	5.10±0.02 <sup>a</sup>	54.15±0.01 <sup>a</sup>

Datos promedio de tres determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de de Tukey Kramer.

**Tabla 20.** Parámetros de Color para carne inoculada con *Salmonella typhimurium*

<b>Material</b>	<b>t (Días)</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>IC</b>
<b>CA<sup>A</sup></b>	3	48.32±0.01 <sup>a</sup>	11.84±0.03 <sup>a</sup>	3.20±0.02 <sup>a</sup>	76.63±0.03
	6	43.45±0.02 <sup>a</sup>	9.58±0.004 <sup>a</sup>	1.76±0.01 <sup>a</sup>	42.00±0.02 <sup>a</sup>
	9	34.28±0.03 <sup>a</sup>	16.12±0.002 <sup>a</sup>	10.35±0.03 <sup>a</sup>	24.33±0.04 <sup>a</sup>
	12	26.94±0.03 <sup>a</sup>	22.07±0.01 <sup>a</sup>	7.80±0.001 <sup>a</sup>	27.29±0.01 <sup>a</sup>
	15	24.89±0.01 <sup>a</sup>	35.96±0.01 <sup>a</sup>	6.78±0.04 <sup>a</sup>	20.95±0.03 <sup>a</sup>
<b>QLP<sup>B</sup></b>	3	25.32±0.03 <sup>a</sup>	8.54±0.04 <sup>a</sup>	4.71±0.02 <sup>a</sup>	72.59±0.02 <sup>b</sup>
	6	31.07±0.05 <sup>a</sup>	9.08±0.01 <sup>a</sup>	7.15±0.07 <sup>a</sup>	41.24±0.06 <sup>a</sup>
	9	29.61±0.07 <sup>a</sup>	12.75±0.03 <sup>a</sup>	13.77±0.09 <sup>a</sup>	10.34±0.02 <sup>a</sup>
	12	48.39±0.03 <sup>a</sup>	12.47±0.05 <sup>a</sup>	12.34±0.02 <sup>a</sup>	21.71±0.04 <sup>a</sup>
	15	39.11±0.01 <sup>a</sup>	5.63±0,08 <sup>a</sup>	9.68±0.03 <sup>a</sup>	15.34±0.08 <sup>a</sup>
<b>QLA<sup>AB</sup></b>	3	29.63±0.01 <sup>a</sup>	28.95±0.03 <sup>a</sup>	4.31±0.02 <sup>a</sup>	49.43±0.02 <sup>b</sup>
	6	32.73±0.02 <sup>a</sup>	7.59±0.02 <sup>a</sup>	5.87±0.01 <sup>a</sup>	40.66±0.01 <sup>a</sup>
	9	68.95±0.07 <sup>a</sup>	10.28±0.01 <sup>a</sup>	14.31±0.04 <sup>a</sup>	10.51±0.03 <sup>a</sup>
	12	48.17±0.08 <sup>a</sup>	16.26±0.02 <sup>a</sup>	7.42±0.04 <sup>a</sup>	47.24±0.04 <sup>b</sup>
	15	42.58±0.05 <sup>a</sup>	4.32±0.01 <sup>a</sup>	12.41±0.05 <sup>a</sup>	8.18±0.03 <sup>a</sup>

Datos promedio de 3 determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de de Tukey Kramer.

Parámetro  $L^*$ : Se puede observar en las tablas que para los tratamientos sin inocular e inoculados y recubiertos con las películas (QLA y QLP) tienen una luminosidad intermedia, las cuales no presentan diferencia significativa, sin embargo para los controles esta luminosidad va disminuyendo lo que nos indica que el color va siendo más oscuro, presentando diferencia significativa.

El parámetro  $a^*$ : indica que la carne presentó magnitudes positivas. Ello corresponde a una componente de color rojo.

El parámetro  $b^*$ : en todos los tratamientos, presentó valores entre 3 a 16, indicando un color ligeramente amarillo.

$C_I$ : indica que el color de las películas se encuentra en el intervalo entre naranja intenso (+20) y rojo intenso (+40).

En función del análisis realizado respecto al color de las películas, se presenta en la figura 33 marcado con un círculo negro, de manera orientativa, la región de color de las muestras de carne. Se puede visualizar que el color de las películas se encuentra en un nivel de intermedia luminosidad y sobre el plano de colores naranja rojizo para los primeros días, para los últimos días de almacenamiento se encuentra en un nivel bajo de luminosidad y sobre el mismo plano de colores.

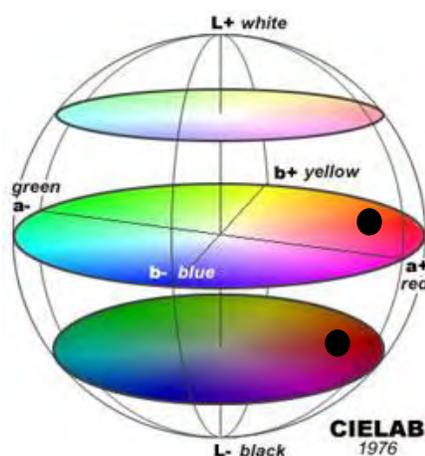


Figura 33. Sistema CIELAB, que representa la escala de colores según los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$

El consumidor relaciona la coloración de la carne con la fresca, siendo un rojo vivo el más consumido, por lo que habrá que intentar de alargar su presencia. La mioglobina es el pigmento responsable del color de la carne, cambiando de continuamente de rojo purpura a rojo brillante y/o café (figura 34). Esto ocurre debido a que el color de la carne es altamente dependiente de la cantidad de oxígeno disponible, así como del tiempo de almacenamiento, pH y la temperatura. Por tanto, manteniendo la mioglobina o reduciendo la metamioglobina, si se forma, se puede extender la vida de la carne fresca. En el presente trabajo se observó que la coloración de la carne fue de color rojo brillante en los primeros 6 días, tanto para los controles como para la carne recubierta con las películas inoculadas y no inoculadas; esto se atribuye a que por ser carne molida tiene mayor exposición al oxígeno por lo que la coloración rojo brillante permanece.

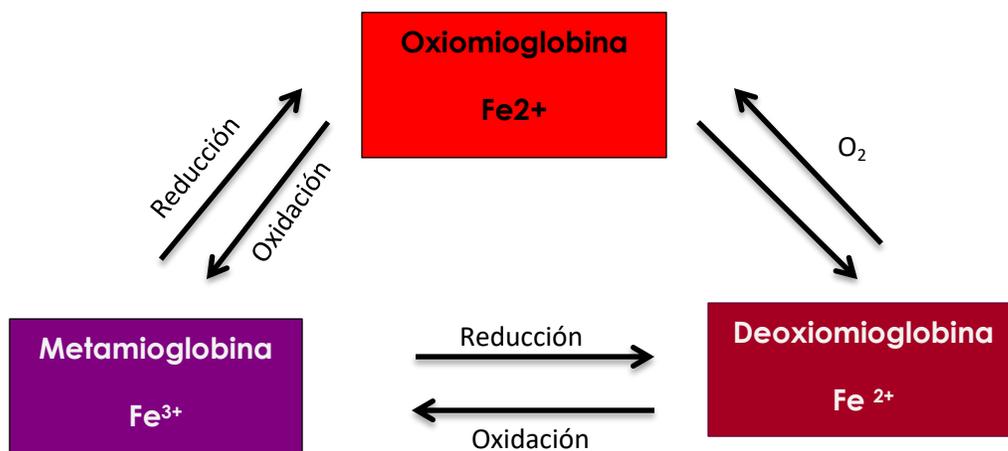


Figura 34. Relación entre mioglobina y color de la carne

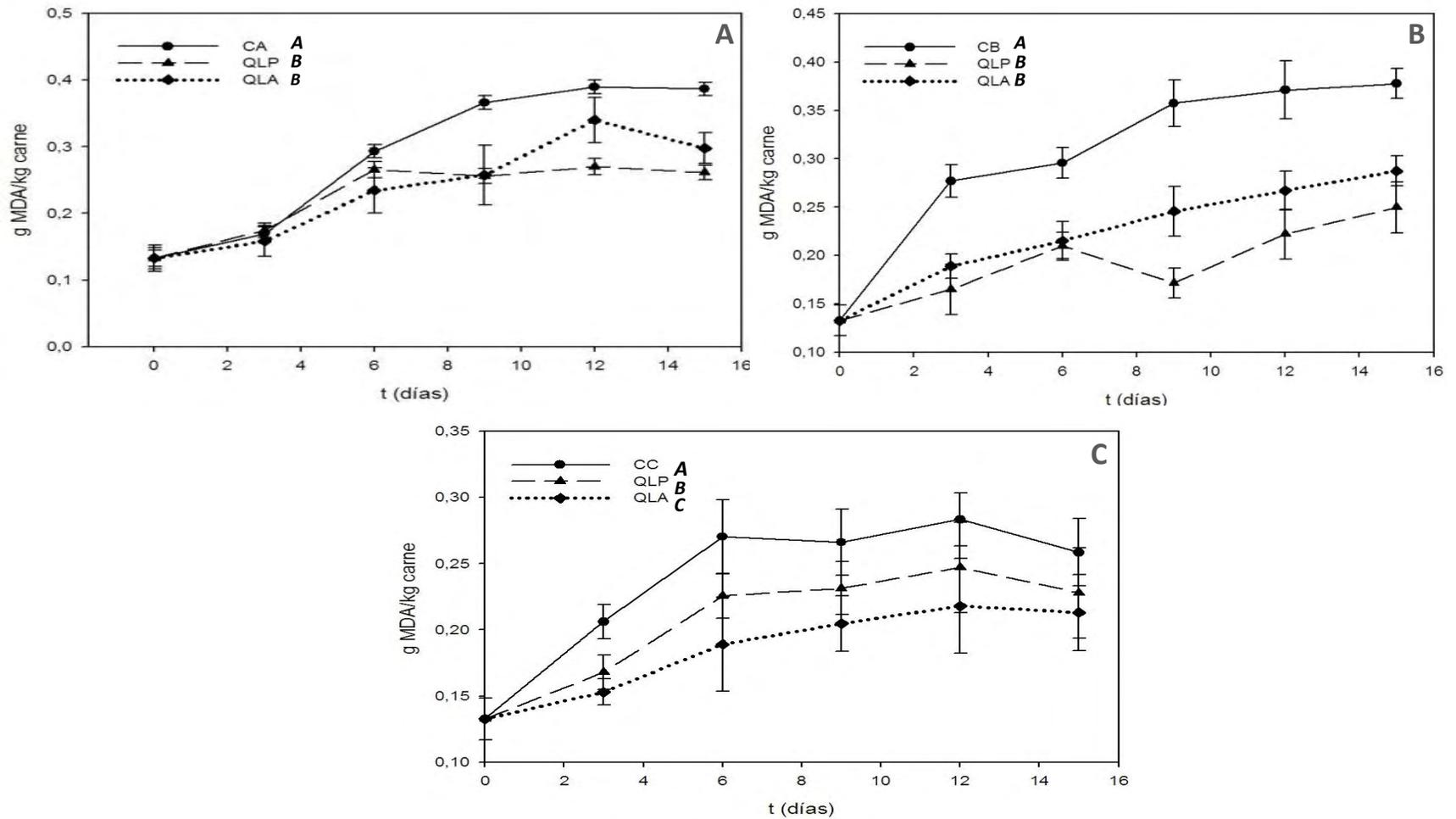
Mientras que la carne inoculada con *S. aureus* y *S. typhimurium*, se fue tornando de rojo brillante a rojo purpura hasta llegar a un color café oscuro, esta coloración se explica, en un principio de rojo brillante a rojo purpura por la producción de aminas y amoniaco, elevando el pH y cambiando la coloración a rojo purpura, después hay una disminución de pH el cual favorece a la liberación del oxígeno incrementando la concentración de CO<sub>2</sub> y a la formación de metamioglobina (Stewart *et al.*,1995).

La carne no inoculada y recubierta en los días 9,12 y 15 se tuvo una coloración roja menos brillante a una coloración rojo púrpura, manteniendo su color característico (rojo brillante) en el interior, este cambio de color se atribuye a la permeabilidad de las películas puesto que al agotarse el oxígeno por las enzimas y algunos microorganismos es convertido en  $\text{CO}_2$ , la actividad reductora del músculo transforma de oximioglobina (rojo brillante) a desoximioglobina (rojo púrpura) Weber *et al* 2016. Park *et al.* 2010, también reportaron una mayor duración del color rojo característico de la carne vacuna al recubrirla con películas de quitosano al 2% p/v en ácido láctico. Vargas *et al.* 2011, aplicaron películas comestibles basadas en quitosano en la superficie de hamburguesas de cerdo, logrando incrementar el contenido de metamioglobina, lo que se tradujo en un mejor aspecto de las hamburguesas.

#### **III.3.4 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

La oxidación lipídica juega un papel importante en el deterioro de los alimentos, que tiene como consecuencia las alteraciones en el aroma, sabor color, la pérdida de determinados nutrimentos y la formación de sustancias potencialmente nocivas. El valor de TBARS es un indicativo de la oxidación lipídica, en el que se mide el contenido de malonaldehído (MDA). El ataque del oxígeno al doble enlace de los ácidos grasos puede ser la causa de la iniciación de las reacciones de radicales libres en la oxidación de lípidos (Abollahi *et al.*, 2013).

Los resultados indican que durante el almacenamiento se observó un aumento estadísticamente significativo, en el valor de TBARS expresado en mg (MDA) por kg de carne, siendo los controles (CA, CB y CC) muestras no recubiertas las que tienden a aumentar los valores con el tiempo, lo que coincide con lo reportado por Sathivel *et al.*, 2005 en cortes de bovino. Los productos secundarios de la oxidación se acumulan y el valor de TBARS aumenta a lo largo del tiempo de almacenaje como se observa en la figura 35.



**Figura 35.** Evolución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico de las muestras de la carne molida no inoculada (A), carne inoculada con *S. aureus*, (B) y *S. typhimurium* (C) a 4 °C y 78% HR. Datos promedio de tres determinaciones. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamiento, utilizando la prueba de Tukey Kramer.

Las muestras recubiertas por las películas QLA y QLP, presentaron valores de TBARS menores que las muestras no recubiertas, lo que revela el poder protector de las películas de quitosano frente a la oxidación secundaria. Resultados similares fueron obtenidos por Darmadji y Izumimoto (1994) observaron que la adición de 1% p/v de quitosano en carne de vacuno molida disminuyó significativamente el valor del indicador de ácido tiobarbitúrico (TBA) en comparación con la muestra control, demostrando que la adición de quitosano disminuye la oxidación de lípidos en la carne resultando en un efecto deseable sobre la mantención del color rojo del producto durante el almacenamiento. Lee *et al.* 2003, observaron que trozos de carne de cerdo recubiertas con películas de quitosano al 1% p/v, presentaron una mayor vida útil y menor oxidación lipídica. Al final del almacenamiento, las películas de quitosano y polietilenglicol (QLP) dieron lugar a un menor valor de TBARS para los tratamientos sin inocular e inoculados con *Sa. aureus* (0.261y 0.250 mg MDA/kg de carne) respectivamente. Las películas actúan como barrera al oxígeno de modo que solo una pequeña cantidad de oxígeno puede entrar en contacto con las muestras disminuyendo la oxidación. En general los recubrimientos mantuvieron valores menores a 0.7 mg MDA/kg carne molida ya que se considera que valores superiores se consideran inaceptables para carne fresca (SAGARPA).

### **III.3.5 Análisis microbiológico**

La actividad antimicrobiana se determinó evaluando Mesófilos aerobios totales, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, los valores medidos iniciales para las muestras de carne molida de 4.9, 5.0 y 4.0 ufc/g respectivamente. La figura 36, muestra los valores de dichos recuentos en las muestras recubiertas con las películas QLA y QLP así como en las no recubiertas (control sin inocular (CA), control positivo CB y CC).

Se obtuvo de manera general que el crecimiento de microorganismos (mesófilos, *S. aureus* y *S. typhimurium*) crecían de manera significativa a lo largo del almacenamiento, presentado en el días 6 los valores más elevados. Esto es de

esperar puesto que hay una degradación y un crecimiento microbiano en la carne con el paso del tiempo.

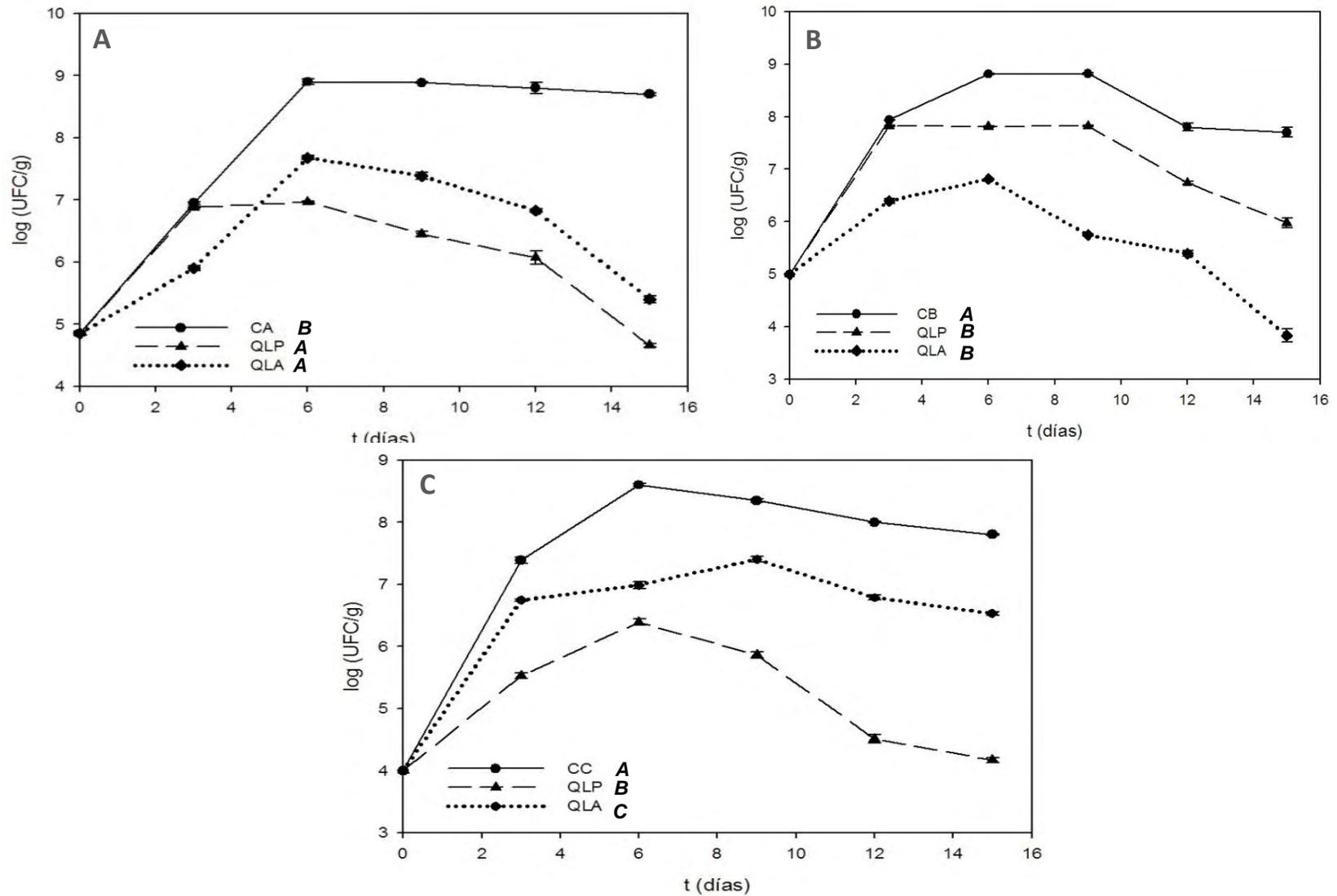
En la figura 36A muestra el crecimiento de colonias de mesófilos, a lo largo de los días para los diferentes tratamientos. Al día 0 se obtiene el mismo resultado para todos los tratamientos, se puede decir que es el estudio de la microbiota en la carne al natural. A partir del día 3 se observa un aumento del crecimiento de microorganismos, especialmente en la muestra control, que no tiene ningún recubrimiento que le proteja y para la película QLP. Se observa que a día 6 es cuando más microorganismos hay. En esta figura se observa también que al día 15 la película que mejor propiedades antimicrobianas tiene es el formulado con polietilenglicol, puesto que es aquel que mejor inhibe el crecimiento microbiano.

La figura 36B muestra el crecimiento de *S. aureus* cultivados a 30 °C, a lo largo de los días de almacenamiento, para los diferentes recubrimientos utilizados. De nuevo, cabe destacar que al no haber presencia de estas bacterias en la carne molida se inoculo  $1 \times 10^5$  ufc/mL, por lo que se obtienen los mismos resultados para todos los tratamientos. Se observa que con los días de almacenamiento hay un crecimiento de bacterias, observándose un máximo el día 6. La película que mejor funciona inhibiendo el crecimiento microbiano de *S. aureus* es el formulado con ácido láctico sin plastificante (QLA) esto corrobora lo obtenido en la parte de actividad microbiana de las películas del presente trabajo. Así mismo Wang (1992) observó que una concentración de alta de quitosano (1.5 % p/v) se requiere para la inactivación completa de *Staphylococcus aureus* después de tres días de incubación a pH 5.5.

La figura 36C muestra el crecimiento de *S. typhimurium* cultivados a 30 °C, a lo largo de los días de almacenamiento, cabe mencionar que al no haber presencia de estas bacterias en la carne molida desde un inicio y para poder ver el efecto antimicrobiano, se inoculo  $1 \times 10^4$  ufc/mL, por lo que se obtienen los mismos resultados para todos los tratamientos en el día 0. Se observa que con los días de almacenamiento hay un crecimiento de bacterias, observándose un máximo el día 6. La película que mejor funciona inhibiendo el crecimiento microbiano de *S.*

*typhimurium* es el formulado con ácido láctico y plastificante polietilenglicol (QLP) esto también corrobora lo obtenido en la parte de actividad microbiana de las películas del presente trabajo. Lee *et al.*, 2003 observaron que las películas de quitosano reducían el crecimiento de *Salmonella typhimurium* en muestras de carne de cerdo.

En general hay un mayor crecimiento bacteriano en las muestras sin ningún tratamiento y se observa que la película QLP es el que tiene un mayor control de antimicrobiano contra mesófilos y *S. typhimurium*. Cabe resaltar que los valores obtenidos para QLP son muy parecidos a la cantidad de microorganismos al tiempo cero, indicándonos no solo una inhibición sino también un efecto bactericida; hecho principalmente atribuido a la acción del quitosano y el ácido láctico. Según la NOM 034-SSA1-1994, los límites para mesofilos es de 5 000 000 UFC/g, *Salmonella* ausente en 25 g de carne y para *S. aureus* (1000 UFC/ g) por lo que en este trabajo se esta dentro de norma, considerando solo la carne que no se inoculo con *S. typhimurium* y *S. aureus* (figura 35A) ya que solo se encontró mesofilos aerobios. El mecanismo de acción del quitosano, se explica por la interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente y las membranas celulares cargadas negativamente, alterando las propiedades de barrera de la membrana externa del microorganismo, cambiando la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones (Lárez, 2008). Por otro lado, se ha observado que el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos ocurre tanto por la forma disociada y no disociada del ácido, siendo, la forma no disociada la que posee mayor actividad (Hsiao *et al.*, 1999). El efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos esta relacionado con su capacidad de atravesar la membrana plasmática microbiana y disociarse en su interior, la acidificación del citoplasma, modifica el pH intracelular, provocando una lisis y una intoxicación (Mani- Lopez *et al.*, 2012). Además de estos hechos, se debe tomar en cuenta otros factores como la temperatura de almacenamiento, humedad relativa, pH y O<sub>2</sub>.



**Figura 36.** Cuenta total en placa de mesófilos aerobios (A) , *S. aureus* (B) y *S. typhimurium* (C) con respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C y 78%HR en la carne molida recubiertas. Datos promedio de tres determinaciones. Histogramas con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

## Conclusiones

Se obtuvo y caracterizó quitosano a partir de quitina obtenida por método biológico y una desacetilación homogénea, obteniéndose un quitosano de peso molecular intermedio de 253 kDa y un grado de acetilación de 12.86 %.

Con el quitosano, ácido láctico y distintos plastificantes (glicerol, polietilenglicol y sorbitol) se prepararon cuatro diferentes materiales. Siendo QLP y QLA los materiales con mayor rendimiento e incorporación de unidades de ácido láctico, además de presentar una mayor actividad antimicrobiana para *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* y ser las películas con menor permeabilidad al vapor del agua.

El empleo de películas de quitosano-ácido láctico y plastificantes (QAL y QLP) resultó una buena alternativa para proteger la carne molida de la oxidación de lípidos y proliferación de microorganismos, reduciendo las cuentas de mesófilos, y patógenos (*Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*), actuando como un envase activo mediante la liberación de componentes antimicrobianos como lo es el ácido láctico así como por la propia acción antimicrobiana de la matriz empleada. Además de mantener el color de la carne, evita la oxidación lípidica, y presentan buenas propiedades mecánicas igual y/o superiores a empaques comerciales.

En investigaciones posteriores, vale la pena investigar más a fondo las propiedades toxicológicas de las películas además de un análisis sensorial para poder optimizar este estudio.

## Bibliografía

- Aguirre R., Laredo Y. (2011). Efecto del ácido oleico sobre las propiedades de transferencia de masa de películas biodegradables de quitosano.
- A.O.A.C., (1990). *Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. 106, 2019-2023.
- Adams, M. y Moss M. (1997). *Microbiología de los Alimentos*, 1ª edición, Zaragoza España: Acribia.
- Albertsson A., Wirsén A. and Qu X (1999). Synthesis and Characterization of pHsensitive *Hydrogels based on Chitosan and D,L-Lactic acid*. *Journal of Applied Polymer Science*. - Vol. 74.
- Alnoman M., Udornpittikul P. & Sarker M. (2016). *Chitosan inhibits enterotoxigenic Clostridium perfringens type A in growth medium and chicken meat*. *Food Microbiology*, Vol. 64, pp 15-22.
- Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J., Shirai, K., Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Polymers*, 2009. Vol. 77.
- Álvarez Varela E. Rotación de antibióticos: una estrategia para paliar la resistencia. *CENIC Ciencias Biológicas*, 2006. - 1: Vol. 37.
- Araya A., Meneses L. (2010). *Influencia de Algunos Ácidos Orgánicos Sobre las Propiedades Físico-Químicas de Películas de Quitosano Obtenidas a Partir de Desechos de Cangrejo*. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, Vol. 23, N. 1, pp 143-148.
- ASTM D882-97 Standar practice for conditioning plastics for testin, 2003.
- Avérous, L. (2008). *Poly(lactic Acid): Synthesis, Properties and Applications*. En M. Naceur Belgacem, & A. Gandini, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Great Britain: ELSEVIER pp. 433-450.

- Badawy, M., Rabea, E. (2009). *Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit*. Postharvest
- Badui, D.S. (2006). *Química de los Alimentos*, 4 edn., (Pearson, México).
- Baranenko D., Kolodyaznaya V. & Zabelina N. *Efecto de la composición y propiedades de los recubrimientos comestibles de quitosano-basado en microflora de carne y productos*. Acta Sci. Pol., Technol. Alimento. Vol. 12, pp 149-157.
- Belcher J.N. 2006. Industrial packaging developments for the global meat market. Meat Science. 74: 143-148.
- Bello-Gil, D., (2007). *Plásticos biodegradables, una alternativa verde*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, 535-539.
- Bernard, D. (1984). *Tratado de microbiología*. 3ª ed. Barcelona: Salvat Editores.
- Bertuzzi, M.A., Armanda, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A.R., Jimenez, P. (2002). *Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos*. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Catamarca,.
- Bhandare s.g., a. Sherikar, a. Paturkar, v. Waskar, r. Zende (2007). *A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops*. Food Control 18: 854-858.
- Biesalski, H.K., (2005). *Meat as a component of a healthy diet- are there any risks or benefits meat is avoided in the diet?* Meat Science, 70:509-524.
- Bonilla, J.; Vargas, M.; Atarés, L.; Chiralt, A. (2014). *Effect of Chitosan Essential Oil Films on the Storage-Keeping Quality of Pork Meat Products*. Food Bioprocess Technol, vol. 7, pp 2443-2450.

- Bourtoom T. and Chinnan M.S., Preparation and properties of rice starchchitosan blend biodegradable films, LWT-Food Science and Technology, 2008. - Vol. 41.
- Brandao Delgado, J.L. y Peña Turcios, A.G. (2012). *Efecto de dos temperaturas y tres combinaciones de plastificante en las propiedades físicas de una película comestible a base de proteína de suero ácido*. pp. 2.
- Brock, T. (1991). *Biology of microorganims*. 6ª ed, New Jersey: Pretice Hall.
- Brody, Aaron L., Bugusu, B., Han, Jung H., Koelsch, Sand C., McHugh, Tara H., (2008) Innovative Food Packaging Solutions, Institute of Food Technologists : Journal of Food Science,. - 8: Vol. 73.
- Cagri, A., Ustunoi, Z., Ryser, E.T. (2001). *Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-Based Edible Films Containing Aminobenzoic or Sorbic Acids*. Journal of Food Science, 66(6), 865–870.
- Canquil, N., Villarroel, M., Bravo, S., Rubilar, M., Shene, C. (2007), *Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria*, Carbohydrate Polymers,- Vol. 68.
- Casariego A., Díaz R., Sergrañes Y., Nieto O., Durán C., López N., Rodríguez M. & González J. (2009). *Modelación de las propiedades mecánicas de películas de quitosana*. Ciencia y Tecnología de Alimentos, Vol. 19, No.1, pp 7-12.
- Castillo Valle E. 2010. Recubrimiento de envases de poliestireno expandido con nanopartículas lipídicas sólidas para generar envases activos, Tesis de Licenciatura Ingeniería en Alimentos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- Catala R. and Gavara R (2001). Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados, Arbor. - 661: Vol. CLXVIII.
- Cerqueira, M., Lima, A., Vicente, A., Teixeira, J., Moreira, R., (2007). *Novel Functional Polysaccharides as Edible Coatings for Cheese*. Food and Agricultural Products: Processing and innovations, vol. 3, 1-18.

- Cervera Fantoni A.L., *Envase y Embalaje, La venta silenciosa, España: ESIC, 2003. - Vol. 2a ed.*
- Charles N., Williams S.K., Rodrick G.E. 2006. Effects of Packaging Systems on the Natural Microflora and Acceptability of Chicken Breast Meat. *Poultry Science*. 85: 1798-1801.
- Chou Y., Kyoon H. and Meyers Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 1998. - Vol. 46.
- Chung, Y.C.; Kuo, C.L.; Chen, C.C. (2005). *Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction*. *Bioresource Technology*. Vol. 96, pp 1473-1482.
- Chung, Y.C.; Su, Y.P.; Chen, C.C.; Jia, G.; Wang, H.L.; Wu, J.C.G.; Lin, J.G. (2004), *Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25, 932-936.
- Cira, L., Huerta, S., Hall, G. M., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(12), 1359–1366.
- Coles, R., McDowell, D. y M. J. Kirwan. (2004). *Manual de envasado de alimentos y bebidas*. 1ª edición. A. Madrid Vicente y Mundi-Prensa. España. P.p. 17-20.
- Corona, I., (2011). *Síntesis y caracterización de las propiedades mecánicas y antifúngicas de las películas de quitosano-co-cítrico*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química
- Corona-Suárez I.J. Síntesis y caracterización de las propiedades mecánicas y antifúngicas de las películas de quitosano-co-cítrico, Tesis de Licenciatura Químico en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- Crank, J., (1975). *The mathematics of diffusion*. *Journal Food Science*, vol. 54, pp 1383-1389.
- Dainelli D., Gontard N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E. and Tobback P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns, *Trends in Food Science & Technology*, 2008. - Vol. 19.

- Darmadji, P.; Izumimoto, M. (1994). *Effects of chitosan and nitrite on the properties of fermented meat*. *Anim. Sci. Technol.* 65(7), 639-646.
- Datta s., a. Akter, i Shah, k. Fatema, t. Islam, a. Bandyopadhyay, z. Khan, d. Biswas (2012). *Microbiological quality Assessment of raw meat and meat products, and antibiotic susceptibility of isolated Staphylococcus aureus*. *Agriculture, Food and Analytical Bacteriology* 2: 187-194.
- Datta, S., Janes, M.E., Xue, Q.G., Losso, J., La Peyre, J.E., 2009. Control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Anatum on the surface of smoked salmon coated with calcium alginate coating containing oyster lysozyme and nisin. *Journal of Food Science* 73, M67-M71.
- De Eugenio M. L.I. (2009). Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: Aplicaciones biotecnológicas, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- Delcenserie V, D. Loncaric, C Bonaparte, M. Upmann, B. china, G. daube, F. Gavini (2008). *Bifidobacteria as indicators of faecal contamination along a sheep meat production chain*. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 276-284.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, V. (2004). *Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables*. *Food Microbiol.*, vol. 21, pp703–714.
- Di Pierro, P; Sorrentino, A.; Mariniello, L.; Valeria, C.L.; Porta, G.R, Chitosan/whey protein films as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life, *LWT-Food Science and Technology*, 2011. - Vol. 44.
- Dongying Jia, Yu Fang and Kai Yao Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soy protein isolate edible films, *Food and Bioproducts processing*, 2009. - Vol. 87.
- Dumitriu S. Polysaccharidees. Structural, diversity and functional versatility, USA: Marcel Dekker, 2005. - Vol. 2a ed.

- Dutta, P.K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G.K.; Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*. 114, 1173-1182
- Elizondo, M. C., & Gallo, A. C. (2011). Use of nanomaterials in biopolymers for food, *77*(4), 292–306.
- Ellermeier C & Slauch J. The genus *Salmonella* in: *Prokaryotes 2006*: 6; 123-158 doi: 10.1007/0.387- 30746-x\_7
- Enríquez, M. Velasco, R. Ortiz, V. (2012) “Composición y Procesamiento de Películas Biodegradables Basadas en Almidón” *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 10 No. 1 (182 - 192) Enero - Junio 2012*
- Ercolini D., Russo F., Torrieri E., Masi P., Villani F. 2006. Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *72 (7): 4663-4671*.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P. and Villani, F., (2006). *Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1990-2001.
- Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., Harispe, R., Marquez, R., (2009). *Películas biodegradables y comestibles en base aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador*. *Revista del laboratorio tecnológico de Uruguay*, vol. 4, 29-38.
- Espadín, A., Vázquez, N., Tecante, A., Tamay de Dios, L., Velasquillo C. Shirai K. (2014). *Fibroblast viability and inhibitory activity against Pseudomonas aeruginosa in Lactic acid-grafted Chitosan Hydrogels*. *Journal of Applied Polymer Science* 131,40252, pp.40252
- Espindola A. (2017). Extracción de quitina calcárea empleando agua bajo condiciones subcríticas a partir de cefalotórax de camarón. Tesis de maestría en biotecnología, Unovercidad Autonoma Metropolitana.
- Evans, J.D., and Sikdar, S.K. 1990. Biodegradable plastics: An idea whose time has come? *Chem. Tech.* 20: 38-42.

- Fang, Y., Tung, M. A., Britt, I. J., Yada, S., Dalgleish, D. G. (2002). *Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins*. Journal of Food Science, vol. 67, pp 188-193.
- Fennema Owen R. *Química de los alimentos*, Zaragoza: Acribia, (1995). - 3ra ed. p. 1258.
- Foldager C, Jakobsen B. W, Lund B., Christiansen S. E., Kashi L, Mikkelsen L R y Lind M, (enero de 2009). Tibial tunnel widening after bioresorbable poly-lactide calcium carbonate interference screw usage in ACL reconstruction. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. Vol. 18.
- Fraqueza M.J., Barreto A.S. 2009. The effect on turkey meat shelf life of modified-atmosphere packaging with an argon mixture. Poultry Science 88 : 1991-1998.
- Garcia I.E., Gago C.L., Fernandez J.L. 2006. Tecnologías de envasado en atmosfera protectora. V t. Informe de Vigilancia Tecnológica. p.1-140.
- Gill C, T. Jones (1995). *The presence of Aeromonas, Listeria and Yersinia in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants*. Food Microbiology 12: 135-141.
- Gimeno, M., Ramírez-Hernández, J.Y., Martínez-Ibarra, C., Pacheco, N., García- Arrazola, R., Bárzana, E. and Shirai, K., (2007). One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. J. Agric. Food Chem. 55: 10345– 10350
- Gontar, N., Guilbert, S., & Cuq, J. (1993). *Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier. Properties of an edible wheat gluten film*. J. Food Sc., 58, 206-211
- Goosen, M., (1997). Applications of chitin and chitosan. United States of America, Ed. Technomic. Johnson, E., Peniston, Q., (1982). *Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. Chemistry and biochemistry of marine foos products*. Westport., AVI publishing, 415-422.
- Groover M.P (1997). *Fundamentos de Manufactura moderna. Materiales, procesos y sistemas*, Pearson-Prentice Hall Hispanoamericana, pp110-123.

- Guilbert, S (2000). *Edible films and coatings and biodegradable packaging*. Bull. Int. Dairy Fed., vol. 346, 10–16.
- Guilbert, S., Biquet, B. (1996). Edible films and coatings. En G. Bureau y J.L. Multon, Food packaging technology, (Vol. 1, pp. 315-353). New York: Wiley-VCH Inc.
- Guilbert, S., Gontard, N. (2005). *Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics*. In: Han J H (Ed.), Innovations in Food Packaging. Oxford, UK: Elsevier Academic Press, pp. 263–276.
- Guzmán Venegas G. (2003). *Efecto del Tipo de Agente Plastificante en Películas de Quitosano*. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ingeniería-UDLA, 4, 6, 8, 13, 21-25.
- Han, J., 2000. Antimicrobial Food Packaging. Food Technology, 54, No. 3, pp.56 65.
- Hewage, S, Vithanarachchi, S. M. (2008). *Preparation and characterization of biodegradable polymer films from cowpea (Vigna unguiculata) protein isolate*. Department of chemistry, Faculty of Science, University of Colombo 03.
- Hirano, S., (1999). *Chitin and chitosan as novel biotechnological materials*. Polymer International, 48, 47-59.
- Hong, S., Son, S., Lee, J., 2008. Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. Journal of Food Engineering, 86, pp. 484-493.
- Horán, R., Domínguez, R., Pacho, J., (2008). *Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación*. Tecnología y Ciencia, 23(2), 79-90.
- Hui, Y. H., Guerrero, I., Rosmini, M. R., 2006. Ciencia y tecnología de carnes. Edición 1ª. Editorial Limusa. México. pp. 634.
- Huis in't Veld, J.H.J, 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. International Journal of Food Microbiology, 33: 1-18.

- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2001. *Microbial Ecology of Foods. 2: Food Commodities. 2a.Edicion.* Editorial Acribia. España. pp. 2-7, 35-36.
- Ikeda, T.; Tazuke, S. (1984). *Biologically-active polycations.4. Synthesis and antimicrobial activity of poly(Trialkylvinylbenzylammonium chloride).* Macromol. Chem. Phys. Vol.185, pp 869-876.
- Ikeda, T.; Tazuke, S. 1984. *Biologically-active polycations.4. Synthesis and antimicrobial activity of poly(Trialkylvinylbenzylammonium chloride).* Macromol. Chem. Phys. 185, 869-876.
- Jawetz; Melnick; Adelberg 2005. *Microbiología medica 25ª edición;* Mc Graw Hill
- Jay, J. (2007). *Modern Food Microbiology. 7ª ed,* USA: Springer.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A., 1994. *Modern food microbiology.* New York, Springer. pp. 27-29, 237- 241.
- Jeon, Y.; Kamil, J.; Shahidi, F. (2002). *Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of h erring and Atlantic cod.* J. Agr. Food Chem. 50(18), 5167-5178.
- Jeon, Y.; Park, P.; Kim, S. (2001). *Antimicrobial effect of chito-oligosaccharides produced by bioreactor.* Carbohydr. Polym. Vol. 44, pp 71-76.
- Jeon, Y.J.; Park, P.J.; Kim, S. K. 2001. *Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor.* Carbohydrate Polymers. 44, 71-76.
- Juarez, C., (2010). *Estudio de las enzimas comerciales en la preparacion de quitina a partir de desperdicios de camaron. Tesis de especializacion en biotecnologia Universidad Nacional Autonoma Metropolitana, Mexico D.F.*
- Kanatt, S., Chander, R., Sharma A., (2008). *Chitosan glucose complex-A novel food preservative.* Food Chemistry, 106, 60-69.
- Khoshgozaran-Abras, S.; Hossein, A. M.; Hamidy, Z.; Bagheripoor-Fallah, N. (2012). *Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan*

*based-films as a function of Aloe vera gel incorporation*, Carbohydrate Polymers. Vol. 87.

- Kirk-Othmer. 2001. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 4<sup>a</sup> ed, 13. CD-ROM. DIALOG OnDisc Books® 3.21.
- Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K.; Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- Koochmaraie M., T. Arthur, J. Bosilevac, M. Guerini, S. Shackelford, T. Wheeler (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science* 71: 79-91
- Krochta, J., (2005). *Control of mass transfer in food with edible-coatings and films*. *Advances in food engineering*, 4, 517-537.
- Kulprathipanja, S., Oroskar, A., (1991). *Separation of lactic acid from fermentation broth with an anionic polymeric absorbent*. U.S. Pat. 5068418. Washington, DC, EEUU.
- Lamarque, G., Cretened, M., Viton, C., Domard, A., (2005). *New rotule of deacetylation of alfa and beta chitins by means of freeze pump out thae cycles*. *Biomacromolecules*, 6, 1380-1389.
- Lárez, C., (2008). *Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica*. UDO Agrícola, vol. 8, 497-499.
- Lee, H.; Park, S.; Ahn, D. (2003). *Effect of storage properties of pork dipped in chitosan solution*. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32(4), 519-25.
- Li, Q., Dunn, E., Grandmaison, E., Goosen, M., (1997). *Applications and properties of chitosan. Applications of chitin and chitosan*. Technomic Publishing Company Inc., 379-390.
- Liu, D., 2008. Epidemiology. En: Liu, D., (Ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*. USA: Taylor and Francis Group, LLC. pp. 27-60.
- Lloyd, L.; Kennedy, J.; Methacanon, P.; Paterson, M.; Knill, C. (1998). *Carbohydrate polymers as wound management aids*, *Carbohydrate Polymers*, - 3: Vol. 37.

- López, M., (2013). *Síntesis y caracterización de materiales con base en quitosano, obtenido mediante desacetilación heterogénea de quitina extraída por un método biológico*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Marsh, K., Bugusu, B., 2007. Food Packaging-Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, 72, pp. 39-55.
- Martínez, G., (2009). *Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación post cosecha de litchi y rambutan*. Tesis de doctorado en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana, México D.
- Martínez-Castellanos G. 2009. *Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación poscosecha de litchi y Síntesis y caracterización de películas de quitosano-cítrico-HPMC 112 rambután*. Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F
- Maza Mejía I. and Jacinto Hernández C. (2007). *Caracterización Físicoquímica de Quitosano para su Aplicación como Biosorbente de Metales*, Revista de la Facultad de Ciencias de la UNI, REVCUNI. Vol. 11, pp 56-62.
- McAfee, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W., Wallace, J. M.W., Bonham, M. P., Fearon, A. M., 2010. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84: 1–13.
- McDonald, K., Sun, D.-W., 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 1–27.
- McHugh, T., Avena, R., Krochta, J., (1993). *Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects*. *Journal of Food Science*, vol. 58, pp 889-903.
- Menéndez-González, I., (1999). *Obtención de ésteres de ácido láctico de interés industrial. Proyecto Fin de Carrera*. Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

- Miramont, S. (2012). *Recubrimientos elaborados a partir de Biopolímeros para el soporte de sustancias antimicrobiana: Carvacrol y Sorbatos*. Tesis de Maestría, UTN.BA
- Miranda, P., Cardenas, G., Lopez, D., Sagahon, A., (2003). *Comportamiento de películas de quitosano compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate*. Journal of the Mexican Chemical Society, vol. 47, pp 1456-1467.
- Moller, S., Pardon, P., Coma, V., (2004). *Antimicrobial and physicochemical properties of chitosano-HPMC-based films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52, pp 6585-6591.
- Monreal, J. L. (1988). *Alcoholes en El Mundo de la Química*, Océano Grupo Editorial, España.
- Mossel, D.A.A., Garcia, B. m. y Strujik, C. B., (2003). *Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos*. Zaragoza, España, Editorial Acribia. Pp. 25-29, 510-515.
- Murillo-Martinez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martinez-Ferez, A., Vernon-Carter, E. J. (2010), *Designing W1/O/W2 double emulsions stabylizaed by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties*. Food hydrocolloids vol. 25, pp 577-585.
- Nemtsev, S., Gamzazade, A., Rogozhin, S., Bykova, V., (2002). *Deacetylation of chitin under homogeneous conditions*. *Applied biochemistry and microbiology*, 36, 521-526.
- Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria.
- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA1-1993. Productos de la carne, carne molida y carne molida moldeada.

- Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. “Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos”.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. “Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos”.
- Nørrung B., J.K. Andersen, S. Buncic (2009). *Main concerns of pathogenic microorganisms in meat*. En: Safety of meat and processed meat, pp. 3-29: Springer.
- Nørrung, B., Buncic, S., 2008. Microbial safety of meat in the European
- O Cliver, D., & Riemann, H. P. (2002). *Foodborn diseases* (2nd. ed.). Academic Press.
- Olabarrieta, I. (2005). *Strategies to Improve the Aging, Barrier and Mechanical* Biol. Technol., 51(1): 110-117.
- OMS, FAO. (2009). *Producción de alimentos de origen animal*. Roma: OMS (Organización Mundial de la Salud).
- Ospina M.S.M., Cartagena V.J.R. 2008. La atmosfera modificada: una alternativa para la conservacion de los alimentos. Redalyc Sistema de Informacion Cientifica. 5 (2): 112-123.
- Ozdemir, M., Flores, J. D. (2007). *Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics*. Journal of Food Engineering 86 (2008) 215–224.
- Pacheco, N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: Caracterización y aplicación. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F.
- Papineau, A.; Hoover, D.; Knorr, D.; Farkas, D. (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. Food Biotechnol. Vol. 5, pp 45-57.
- Papineau, A.; Hoover, D.; Knorr, D.; Farkas, D. 1991. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. Food Biotechnol. 5, 45-57.

- Park, H., Chinnan, M., (1995). *Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials*. Journal Food Engineering, vol. 25, pp 496-507.
- Park, H., Chinnan, M., (1995). *Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials*. Journal Food Engineering, vol. 25, pp 496-507.
- Park, S.; Marsh, K.; Dawson, P. (2010). *Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension*. Meat Sci. Vol. 85, pp 493-499.
- Pettersen M.K., Mielnik M.B., Eie T., Skrede G., Nilsson A. 2004. Lipid oxidation in frozen, mechanically deboned turkey meat as affected by packaging parameters and storage conditions. Poultry Science 83: 1240-1248.
- Pillai C, Paul W, Sharma C. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. (34), 641-678.
- Pillai, C., Willi, P., Sharma, C., (2009). *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. Progress in Polymer Science, 34, 641-678.
- Plascencia Jatomea M. (2004) *Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas*, Tesis de Doctorado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Podpečan b., a. Pengov, s. Vadnjal (2007). *The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria Staphylococcus aureus*. Slovenian Veterinary Research. 44: 25-30.
- Pranoto, Y., Salokhe, V. M., Rakshit, S. K. (2005). *Physical and antibacterial properties of alginatebased edible film incorporated with garlic oil*. Food Research International, vol. 38, 267-272.
- *Properties of Chitosan, Whey and Wheat Gluten Protein Films*. Tesis de Doctorado. Kungliga Tekniska Högskolan (KTH), Estocolmo, Suecia, vol. 15, 23.

- Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smaghe, G., Steurbaut, W., (2003). *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action*. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Ravi Kumar, M., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. (2004). *Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives*. *Chem Rev.*, 104, 6017-6084.
- Ritthidej, Koizumi, T., (2002). *Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films*. *International Journal of Pharm*, vol. 232, 563-576.
- Rosales-Oballos, Y.; Raybaudi-Massilia, R.; Mosqueda-Melgar, J.; Tapia de Daza, M. S.; Tomé- Boschian, E. (2012). *Propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de plúculas de quitosano y películas de alginato de sodio con aceites esenciales y nisina*. *Revista de la Facultad de Farmacia* 54 (2): 7-16.
- Rosero Ramírez, Y. S. (2011). *Estudio de la reacción de producción de isosorbida por deshidratación de sorbitol*. Tesis Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá D.C., Colombia. Pág. 12-24
- Ruiz M., Gallo G., Montenegro A. (2016), *Obtención y caracterización de biofilms a base de quitosano*. *Revista de la Sociedad Química de México*. pp 35-40
- Sandoval L., López M., Montes E., Espadín A., Tecante A., Gimeno M. & Shirai K. *Inhibition of Listeria monocytogenes in fresh cheese using Chitosan- Grafted lactic acid Packaging*. *Jornal Molecules*. Vol. 21, pp 469-479.
- Shahidi F.; Arachchi, J.K.V.; Jeon, Y.L. (1999). *Food applications of chitin and chitosans*. *Trends in Food Science & Technology*. 10, 37-51.
- Sharafati F., Taghizadeh M. & Mahmoud R. (2015). *Effect of chitosan incorporated with cumin and eucalyptus essential oils as antimicrobial agents on fresh chicken meat*. *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 40, pp 396–404.

- Shiku, Y., Hamaguchi, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. (2004), *Effect of Surimi Quality on Properties of Edible Films Based on Alaska Pollack*. Food Chemistry vol. 86 pp 493–499
- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González, R., & Hall, G. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology*. (28), 446- 452.
- Soliva, R., Martín, B., (2001). *Envasado de alimentos mediante recubrimientos comestibles*. Alimentarias, vol. 9, 29-37.
- Sorheim O., Nissen H. 2008. Tecnología actual para el empaqueo de carne con atmosferas modificadas. Mundo Lacteo y Carnico. 10-14 pp.
- Sothornvit, R., Krochta, J., (2000). *Water Vapor Permeability and Solubility of Films from Hidrolyzed Whey Proyein*. Food Engineering and Physical Properties, vol. 65, pp 700-703.
- Sperling, L., (2006). Introduction to Physical Polymer Science. *Canadá: Jhon Wiley & Sons*, 3, 1292-1300.
- Sprajcar M, Horvat P & Krzan A (2012) Biopolymers and bioplastics: plastics aligned with nature, Plastique proyect. Innovative value chain for development for sustainable plastics in Central Europe. *European Union*. pp. 1-32.
- Stanch N.; Martino P.; Gentilini E.; Reinoso E.; Echeverria M.; 2007. Microbiología Veterinaria. 1ra. ed. Argentina; inter- Médica. pp 2010-215
- Sweetie R; Kanatt, M.S.; Rao, S. P.; Chawla, A. S. (2012). *Active chitosan-plyvinyl alcohol films with natural extracts*. Food Hydrocolloids 29: 290-297.
- Taik L.K. 2010. Quality and safety aspects of meat products as affected by various physical manipulations of packaging materials. Meat Science. 86: 138-150.
- Tharanthan, R., (2003). *Biodegradable films and composite coatings: past, present and future*. Trends in food science and technology, 14, 71-78.

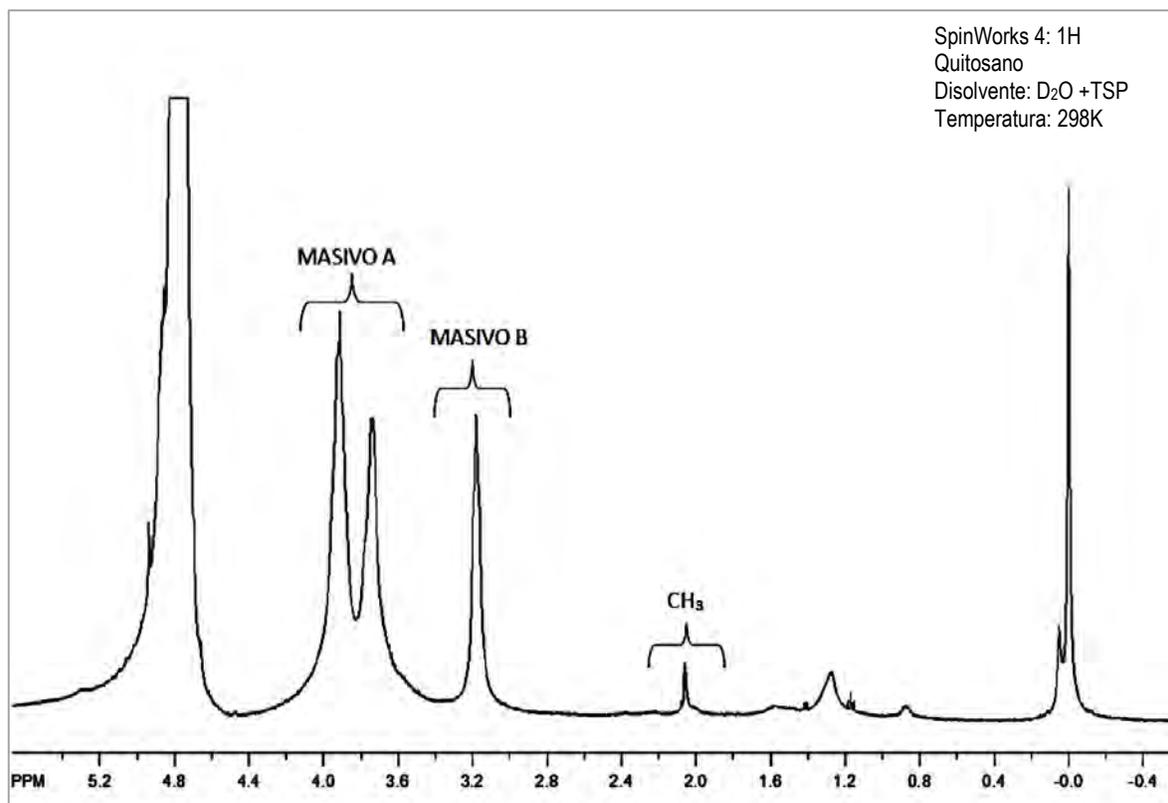
- Trejo, V., Aragón, N., Miranda, P., (2001). *Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán*. Revista de la Sociedad Química de México, vol. 45, pp 1-5.
- Ubonrat, S.; Bruce, R.H. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporates with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 24: 770-775.
- Union. *Meat Science*, 78: 14–24.
- Vaidya, A., N., Pandey, R., Mudliar, S., Suresh, M., Chakrabarti, T., Devotta, S., (2005). *Production and recovery of lactic acid for polylactide*. An overview. *Environent. Sciencie Technology*, 35, 429-467.
- Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A. (2011) *Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers*. *Procedia. Food Sci.* Vol. 1, pp 39-43.
- Villada S.H., Acosta H.A., Velasco R.J. 2006. Biopolimeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*. 12 (2): 5-13.
- Wagner, M. and McLauchin, J., 2008. Biology. En:Liu, D., (Ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*. USA: Taylor and Francis Group, LLC. pp. 3-26.
- Wang, G. (1992). *Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan*. *Food Prot.* Vol. 55, pp 916-919.
- Wolffs P., P. Radstrom (2006). *Real-time PCR for the detection of pathogens in meat*. Capítulo 6, En: *Advanced Technologies for Meat Processing*, L.M.L. Nollet y F. Toldrá, Ed., Food Science and Technology- New York-Marcel Dekker, pp. 131- 154.
- WU, J.; LIU, H.; GE, S.; WANG, S.; QIN, Z.; CHEN, L.; ZHENG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Q. (2015). *The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes*. *Food Hydrocolloids*, vol. 43, pp 427-435.
- WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. (2012). *Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid*

*dispersion method*. LWT - Food Science and Technology, vol. 48, pp 283-290.

- Yu-Hernandez, P., (2004). *Efecto de la mezcla de plastificantes en las propiedades físicas, mecánicas y de transporte de películas de quitosano*. Tesis de licenciatura Escuela de ingeniería UDLA.
- Zamudio, P., (2008). *Caracterización estructural de películas elaboradas con almidón modificado de plátano y con quitosano*. México: Instituto Politécnico Nacional: Centro de Desarrollo de Productos bióticos.
- Zivanovic, S.; Shuang, C.; Draughon, F. (2004). *Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils*. J. Food Sci. vol. 70, pp 45-51.

## Anexos

### 1. Caracterización de quitosano



**Figura 37.** Espectro de H-RMN de quitosano a partir de quitina extraída biológicamente de desperdicio de camarón.

### 2. Analisis de H-RMN de los copolímeros

En la figura 37 se observa que alrededor de 2 ppm aparece la primera banda correspondiente a los metilos del N-acilado quitosano, entre 3-3.4 ppm aparece el masivo B, que corresponde a los 1H relacionados con los C 2 y por ultimo de 3.5-4.2 ppm aparece el masivo A que corresponde a los 1H relacionados con los C 3-6 de la molécula. El masivo A y B son las bandas importantes para el cálculo de la RM y %FM.

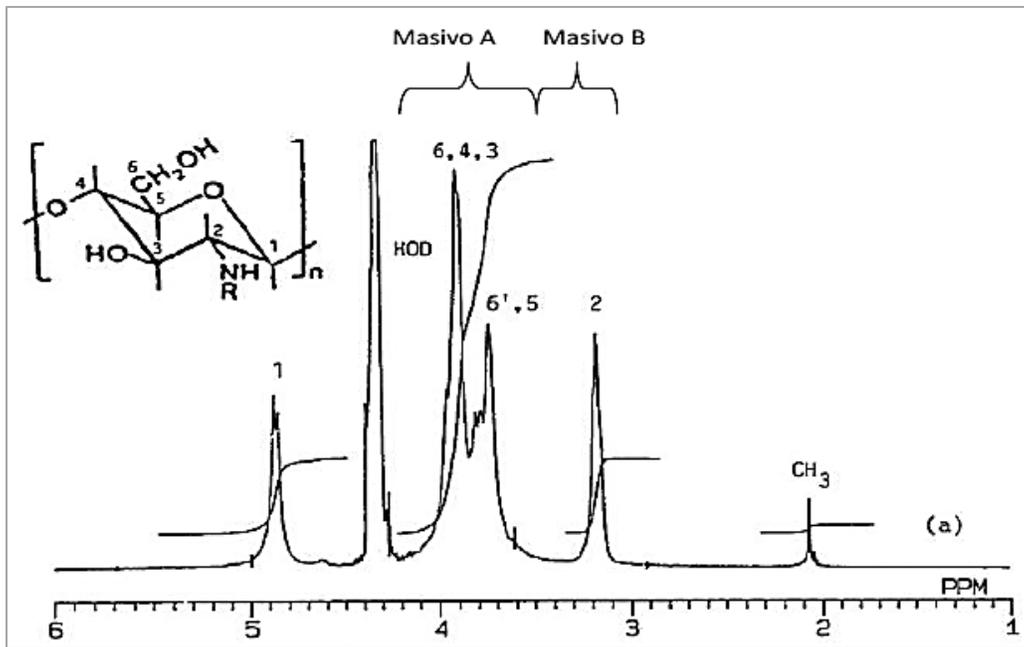


Figura 38. Espectro de RMN-H a 400MHz de quitosano en medio ácido de acuerdo a Hirai et al. (1991)

En la figura 38 se observa que la banda principal de <sup>1</sup>H relacionados al carbono metílico del ácido láctico aparecen de 1.3-1.4 ppm, que es la banda importante para el cálculo de relación molar y por ciento de fracción molar.

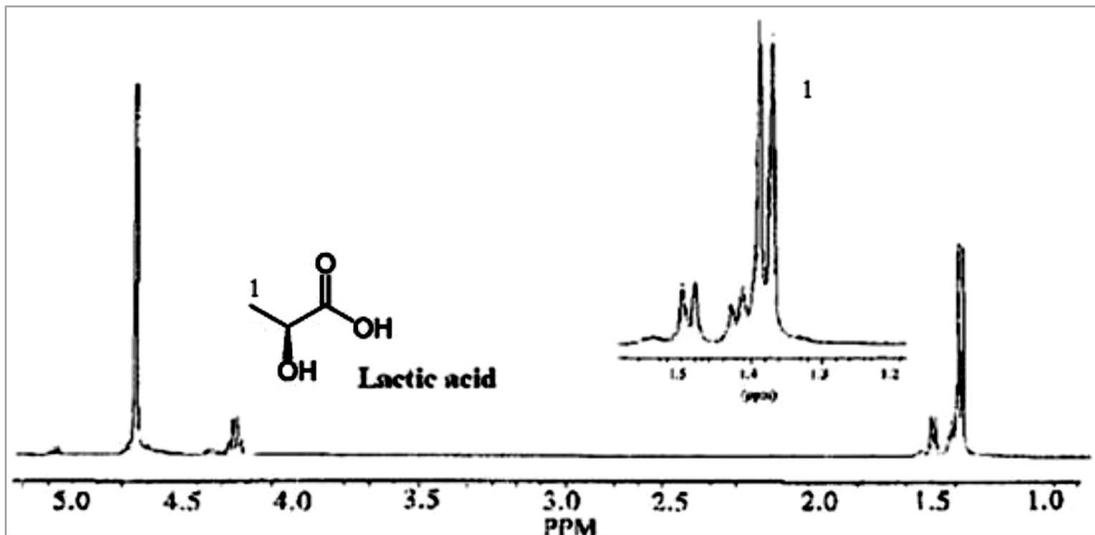
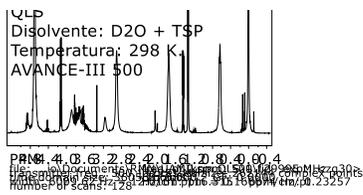
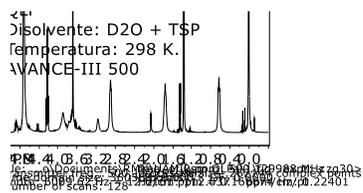


Figura 39. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400MHz de ácido láctico en D<sub>2</sub>O de acuerdo a Qu et al. (1999).





**Figura 42.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400MHz de QLS en medio ácido.



**Figura 43.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400MHz de QLP en medio ácido.

### 3. Análisis estadísticos de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias

#### Etapa II. Formulación, preparación y caracterización de películas QLA, QLG, QLS y QLP

##### 1. Peso de las películas

##### 1.1 ANOVA

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean			Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: material	3	3875	129.5	3,46	0,000000*	0.022
Error	60	22426	373.8			
Total	63	26301				

\* Term significant at alpha = 0,05

#### Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Material	N	medias	Grupos
QLP	16	18,08	A
QLS	16	0,1267	A
QLA	16	0,0995	A
QLG	16	0,09375	A

##### 1.2 Espesor de las películas

##### ANOVA

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean			Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: material	3	56,18	18,726	5,12	0,000000*	0,003
Error	60	219,31	3,655			
Total	63	275,48				

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.2.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Material	N	medias	Grupos
QLA	16	0,8692	A
QLG	16	0,8909	A
QLS	16	1,0088	A
QLP	16	3,083	B

### 1.3 Permeabilidad de Vapor de Agua (PVA)

#### ANOVA

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: material	3	54,18	19,726	5,22	0,000000*	0,004
Error	60	229,21	3,455			
Total	63	276,48				

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.3.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Material	N	medias	Grupos
QLA	16	0,8692	A
QLG	16	0,8909	A
QLS	16	1,0088	A
QLP	16	0,8723	A
PVC	16	3,083	B

### 1.4 Permeabilidad a gases (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: material	3	56,18	18,726	5,12	0,000000*	0,003
Error	60	219,31	3,655			
Total	63	275,48				

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.4.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Material	N	medias	Grupos
QLA	16	0,8692	A
QLG	16	0,8909	A
QLS	16	1,0088	A
QLP	16	3,083	B

## 1.5 Color

### Anova (L\*)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: Tratamiento	3	56,54197	18,84732	0,83	0,503879	0,178163
S(A)	12	273,3697	22,78081			
Total (Adjusted)	15	329,9117				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.5.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLS	4	83,06	A
QLP	4	86,815	A
QLG	4	87,345	A
QLA	4	87,8125	A

### ANOVA (a\*)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: Tratamiento	3	1,159475	0,3864917	18,14	0,000094*	0,99984
S(A)	12	0,2557	2,13E-02			
Total (Adjusted)	15	1,415175				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.5.1.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
4	4	-0,48	A
2	4	-0,115	B
1	4	-0,07	B
3	4	0,28	C

#### ANOVA (b\*)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: Tratamiento	3	34,87252	11,62418	3,17	0,063973	0,581261
S(A)	12	44,07065	3,672554			
Total (Adjusted)	15	78,94318				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.5.1.3 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLG	4	4,1475	A
QLA	4	5,38	A
QLS	4	6,715	A
QLP	4	8,1025	A

#### ANOVA ( $\Delta E$ )

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: Tratamiento	3	11169,77	3723,256	0,94	0,449559	0,198741
S(A)	12	47280,98	3940,082			
Total (Adjusted)	15	58450,75				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.5.1.4 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLA	4	15,525	A
QLG	4	15,685	A
QLP	4	20,48	A
QLS	4	78,075	A

### 1.5.2 ANOVA (CI)

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Tratamiento	3	5,186319	1,728773	0,42	0,741068	0,110807
S(A)	12	49,23203	4,102669			
Total (Adjusted)	15	54,41834				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.5.2.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLS	4	-1,5225	A
QLP	4	-0,2875	A
QLG	4	-0,2525	A
QLA	4	-0,11	A

### 1.6 Pruebas antimicrobianas

#### Anova (% inhibición *S. typhimurium*)

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: material	4	1,522325	0,3805812	14,47	0,000000*	0,999999
S(A)	125	3,2873	0,0262984			
Total (Adjusted)	129	4,809624				
Total	130					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.6.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLP	26	0,2024615	A
QLA	26	0,2885385	AB
QLG	26	0,3613077	B
QLS	26	0,3637308	B

### ANOVA (% Inhibición *Sta. aureus*)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: material	3	6709,577	2236,526	4,36	0,006288*	0,858282
S(A)	100	51328,54	513,2854			
Total (Adjusted)	103	58038,12				
Total	104					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.6.1.2 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLG	26	22,65385	A
QLS	26	28,46154	AB
QLA	26	38,30769	AB
QLP	26	43,11538	B

## Etapa III Etapa III. Evaluación de películas como envase y efecto inhibidor contra *S. typhimurium* y *S. aureus* en carne (molida) de bovino

### 1. % PWR

#### 1.1 ANOVA (sin inocular)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: materialx	2	452,3268	226,1634	6,44	0,003622*	0,882849
S(A)	42	1473,876	35,09229			
Total (Adjusted)	44	1926,203				

<b>Total</b>	45
--------------	----

### 1.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLP	15	13,42867	B
QLA	15	18,52867	AB
CONTROL	15	21,05067	A

### 1.2 ANOVA (*Sta. aureus*)

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Tiempo	4	1201,85	300,4624	31,37	0,000000*	1
S(A)	40	383,1781	9,579452			
Total (Adjusted)	44	1585,028				
Total	45					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.2.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLP	15	13,98	B
QLA	15	18,10	B
CONTROL	15	20,24	A

### 1.3 ANOVA (*S. tiphymurium*)

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: material	2	11,57157	5,785787	0,14	0,874068	0,069413
S(A)	42	1799,628	42,84829			
Total (Adjusted)	44	1811,2				
Total	45					

\* Term significant at alpha = 0,05

### 1.3.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLA	15	14,97333	A
control	15	15,388	B
QLP	15	16,19467	A

## 1.4 pH

### 1.4.1 ANOVA (sin inocular)

---

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: tratamiento	2	7,240711	3,620356	25,51	0,000000*	0,999998
S(A)	51	7,236622	0,1418945			
Total (Adjusted)	53	14,47733				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

---

#### 1.4.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

---

Group	Count	Mean	Groups
QLA	18	5,8	B
QLP	18	5,9	AB
CA	18	6,6	A

---

### 1.4.2 ANOVA (Sta. aureus)

---

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: tratamientox	2	6,135181	3,067591	50,08	0,000000*	1
S(A)	51	3,124056	6,13E-02			
Total (Adjusted)	53	9,259237				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

---

#### 1.4.2.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

---

Group	Count	Mean	Groups
QLP	18	5,54	B
QLA	18	5,697222	B
CB	18	6,320556	A

---

### 1.4.3 ANOVA (*S. tiphymurium*)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: tratamientox	2	9,064014	4,532007	36,05	0,000000*	1
S(A)	51	6,412194	0,1257293			
Total (Adjusted)	53	15,47621				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.4.3.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLA	18	5,569445	B
QLP	18	5,781667	B
CB	18	6,525	A

### 1.5 % Humedad

#### 1.5.1 ANOVA (sin inocular)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: material	2	16,14815	8,074074	1,27	0,290688	0,262706
S(A)	51	325,2778	6,377995			
Total (Adjusted)	53	341,4259				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.5.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
CA	18	68,83	A
QLA	18	69,61	B
QLP	18	70,17	C

### 1.5.2 ANOVA (Sta. aureus)

Analysis of Variance Table					
Source		Sum of	Mean		Prob
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level
A: MATERIALx	2	49,37037	24,68518	3,07	0,054855
S(A)	51	409,4445	8,028322		
Total (Adjusted)	53	458,8148			
Total	54				

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.5.2.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLP	18	68,16666	B
CB	18	68,83334	A
QLA	18	70,44444	B

### 1.5.3 ANOVA (S. tiphymurium)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: materialxx	2	190,4815	95,24074	10,1	0,000201*	0,9807
S(A)	51	480,7222	9,425926			
Total (Adjusted)	53	671,2037				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.5.3.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLA	18	65,83334	A
QLP	18	69,22222	B
QLG	18	70,22222	C

## 1.6 %ATT

### 1.6.1 Anova (sin inocular)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: MATERIAL	2	8,75E-02	0,0437463	1,82	0,171844	0,363219
S(A)	51	1,223567	0,0239915			
Total (Adjusted)	53	1,311059				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.6.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
CA	18	0,2727778	A
QLP	18	0,2777778	B
QLA	18	0,3605556	C

### 1.6.2 Anova (Sta. aureus)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: MATERIALx	2	0,4236111	0,2118056	6,84	0,002331*	0,905599
S(A)	51	1,578722	3,10E-02			
Total (Adjusted)	53	2,002333				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.6.2.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
CB	18	0,2127778	A
QLP	18	0,3933333	B
QLA	18	0,4072222	B

### 1.6.3 Anova (*S. tiphymurium*)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: MATERIAL2	2	0,109737	5,49E-02	2,87	0,065647	0,5384
S(A)	51	0,9735833	1,91E-02			
Total (Adjusted)	53	1,08332				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.6.3.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLP	18	0,1851111	1 B
QLA	18	0,2053889	AB
CC	18	0,2362222	3 A

### 1.7 Grado de oxidación (TBARS)

#### 1.7.1 ANOVA (sin inocular)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: C2	2	4,12E-02	2,06E-02	3,07	0,055235	0,567299
S(A)	51	0,342399	6,71E-03			
Total (Adjusted)	53	0,3835813				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.7.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
CA	18	0,2222222	A
QLA	18	0,3127778	A
QLP	18	0,3222222	A

### 1.7.2 ANOVA (*Sta. aureus*)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: MATERIAL	2	0,1160963	5,80E-02	9,56	0,000297*	0,974547
S(A)	51	0,3096105	6,07E-03			
Total (Adjusted)	53	0,4257068				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.7.2.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLA	18	0,1851111	1 B
QLP	18	0,2053889	B
CB	18	0,2362222	3 A

### 1.7.3 ANOVA (*S. tiphymurium*)

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: C10	2	2,38E-02	1,19E-02	4,89	0,011410*	0,781031
S(A)	51	0,1243572	2,44E-03			
Total (Adjusted)	53	0,1482025				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.7.3.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLA	18	0,1851111	C
QLP	18	0,2053889	B
CC	18	0,2362222	A

## 1.8 Pruebas Microbiológicas

### 1.8.1 ANOVA (Mesófilos aerobios totales)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: MATERIAL	2	45,64835	22,82417	13,46	0,000020*	0,996811
S(A)	51	86,50021	1,696082			
Total (Adjusted)	53	132,1485				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.8.1.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLP	18	5,978889	A
QLA	18	6,341111	A
CONTRO	18	8,085	B

### 1.8.2 ANOVA (*Sta. aureus*)

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: MATERIAL	2	14,56785	7,283924	2,83	0,068587	0,53092
S(A)	51	131,4733	2,577908			
Total (Adjusted)	53	146,0411				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

#### 1.8.2.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLA	18	7,19	B
QLP	18	7,309444	B
CB	18	8,346666	A

### 1.8.3 (S. tiphymurium)

---

Analysis of Variance Table						
Source	Sum of	Mean		Prob	Power	
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0,05)
A: MATERIALxx	2	55,21801	27,609	16,28	0,000003*	0,999366
S(A)	51	86,46412	1,695375			
Total (Adjusted)	53	141,6821				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0,05

---

#### 1.8.3.1 Prueba de comparación de medias: Tukey-Kramer

Group	Count	Mean	Groups
QLP	18	5,076111	A
QLA	18	6,41	B
CC	18	7,550556	C