

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES CON
BASE EN QUITOSANO FUNCIONALIZADO ENZIMÁTICAMENTE**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. en C. Leonor Zavaleta Avejar

DIRECTORA DE LA TESIS

Dra. Elsa Bosquez Molina

Co-DIRECTOR

Dr. Miquel Gimeno Seco

ASESORES

Dr. Juan Pablo Pérez Orozco

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

México, D.F. a 19 de diciembre del 2014

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

Se agradece al proyecto CONACyT SEP BASICA 165757 por el financiamiento parcial de este proyecto de investigación.

México, D.F. a 19 de diciembre del 2014

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES CON
BASE EN QUITOSANO FUNCIONALIZADO ENZIMÁTICAMENTE**

Que presentó

M. en C. Leonor Zavaleta Avejar

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Elsa Bosquez Molina

Co-director: Dr. Miquel Gimeno Seco

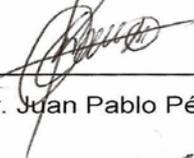
Asesores: Dr. Juan Pablo Pérez Orozco

Asesor: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Jurado:

Presidente: 
Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Secretario: 
Dra. Silvia Bautista Baños

Vocal: 
Dr. Juan Pablo Pérez Orozco

Vocal: 
Dr. Alberto López Luna

DEDICATORIA

A mis padres por su ejemplo de responsabilidad y lucha para conseguir lo que uno se propone.

A Miriam, Miguel y Daniel por su apoyo y cariño.

A Arturo, Megan, Laura, Misai y Lauro por su alegría y amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo lo recibido.

A mis padres por enseñarme a ser responsable, apoyarme en mis proyectos y por su amor.

A la Dra. Elsa Bosquez Molina por la dirección de este trabajo, su apoyo, su paciencia, sus enseñanzas, consejos, comentarios, por la confianza brindada y por contribuir en mi formación profesional.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo, sus enseñanzas, asesorías, consejos, correcciones e infraestructura de su laboratorio.

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, a la Dra. Silvia Bautista Baños y a la M. en C. Mónica Hernández López por su asesoría brindada de manera muy oportuna e incondicional, por sus comentarios, recomendaciones, correcciones y por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Juan Pablo Pérez Orozco por su amistad, asesoría, dedicación y por contribuir en mi formación personal y profesional.

Al Dr. Alberto López Luna por su amistad, asesoría, recomendaciones, paciencia, por revisar este trabajo y enriquecerlo con sus comentarios.

A mis compañeros y amigos de esta institución, por su apoyo, consejos, ayuda en todo momento, experiencias, por los gratos momentos, sobre todo por hacer agradable mi estancia en la UAM-I. Mil gracias.

A mis amigos del Instituto Tecnológico de Zacatepec por la confianza e impulsarme a lograr una meta más.

Al Instituto Tecnológico de Zacatepec que vía Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) me brindó su apoyo para la realización de los estudios de doctorado.

RESUMEN

Actualmente, hay un creciente interés en los polímeros sustentables particularmente en aplicaciones básicas como el embalaje, películas y recubrimientos comestibles que se biodegradan en condiciones controladas de almacenamiento con el fin de atenuar el creciente problema de los desechos de materiales sintéticos a nivel mundial. Además se busca en éstos la baja o nula toxicidad, para el caso de películas comestibles. En este sentido, el Quitosano y sus derivados han demostrado un gran potencial como material de embalaje debido a su poder antimicrobiano inherente, baja toxicidad, material formador de película, así como sus propiedades físicas y químicas versátiles tal como lo han señalado varios investigadores en los últimos tiempos. El quitosano es un derivado desacetilado del biopolímero quitina que se encuentra principalmente en el exoesqueleto de crustáceos y en menor medida en algunos hongos. Un aspecto relevante y diferenciador del quitosano y que determina muchas de sus propiedades es el hecho de poseer grupos amino libres en sus unidades de repetición.

Como resultado del interés en esta biomacromolécula, se ha propuesto una amplia gama de materiales con base en quitosano por medio de modificaciones químicas o enzimáticas sobre la cadena principal de este polisacárido para mejorar su solubilidad en agua, propiedades antimicrobianas, capacidad floculante, la absorbancia y adhesividad, sin dejar de ser biodegradable y biocompatible, para posibles aplicaciones en biomedicina, conservación de alimentos o el tratamiento de agua. Las modificaciones químicas consisten principalmente en la inserción de pequeños grupos funcionales tales como alquilo, carboximetilcelulosa, sacáridos u oligosacáridos para aumentar la solubilidad a pH neutro y alcalino sin afectar a su carácter catiónico. Otros compuestos tales como ciclodextrinas y ácidos (p-aminobenzoico, lactobiónico, siálico y poliacrílico) también se han utilizado para conferirle capacidad de eliminación de colorantes textiles, liberación controlada de fármacos, curación de heridas, inhibición de microorganismos, capacidad antioxidante y aumento de la hidrofiliidad. A pesar de la posibilidad de modificar este polímero por medios químicos, las modificaciones enzimáticas ofrecen rutas alternativas, especialmente cuando los materiales se aplicarán a productos alimenticios debido a que se minimizan los peligros asociados con los reactivos tóxicos, además las condiciones de reacción son suaves y amigables con el ambiente.

En este sentido se realizó la inserción enzimática de cadenas alquílicas hidrofílicas en la cadena del quitosano utilizando octil galato (OG) y peroxidasa de rábano (HRP) como biocatalizador. La estructura química del compuesto quitosano-co-octil galato se corroboró por ATR-FTIR, $^1\text{HRMN}$, potencial ζ , grupos aminos libres. Para predecir el potencial de aplicación del material resultante se estudiaron sus propiedades por reología, viscosidad intrínseca, capacidad antioxidante mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) y actividad antimicrobiana. La capacidad antioxidante determinada por EPR de los quitosanos funcionalizados mostró que la reducción en la intensidad de resonancia paramagnética del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) incrementó con el grado de inserción, lo cual está relacionado con el anillo aromático del OG. El quitosano con mayor grado de inserción de OG exhibió una capacidad antioxidante hasta del 81%. Los grupos aminos incrementaron al aumentar el grado de inserción, lo cual está relacionado con mayor actividad antimicrobiana. Los materiales en solución de ácido acético o ácido láctico mostraron un comportamiento de flujo reodelgazante el cual incrementó con el grado de inserción. Las propiedades viscoelásticas de los materiales en solución se determinaron por métodos oscilatorios, los resultados mostraron un comportamiento viscoelástico de líquido. La elasticidad de las soluciones disminuyó con la adición del plastificante. El quitosano con mayor grado de inserción en solución de ácido acético tuvo propiedades viscoelásticas que le confieren estructura y estabilidad las cuales son deseables para el desarrollo de películas o recubrimientos. Los derivados tienen efecto fungistático *in vitro* sobre los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*. También se desarrollaron formulaciones para la elaboración de películas con base en los materiales obtenidos. Se caracterizó mediante propiedades de barrera, mecánicas y topológicas. Los valores de la permeabilidad al vapor de agua indican que las películas pueden ser empleadas para la conservación de frutas y vegetales. Topológicamente, las películas con glicerol presentaron una estructura ligeramente rugosa y con poros, esto se vio reflejado en las propiedades mecánicas y de barrera, así mismo se incrementó el esfuerzo a la tensión, el porcentaje de elongación así como la permeabilidad al vapor de agua (10.33 ± 0.06 kPa, 4.11 ± 0.09 % y $6.35 \pm 0.38 \times 10^{-4}$ g mmh $^{-1}$ m $^{-2}$ kPa $^{-1}$). En cuanto a las pruebas de aplicación de las películas obtenidas sobre frutos de pera D'Anjou y mango Ataulfo, se encontró que la velocidad de pérdida de peso disminuyó comparada con el control, la pérdida de peso de las peras Anjou recubiertas fue de 2 %, mientras que para los mangos Ataulfo la pérdida de peso fue 8 %.

Palabras clave: quitosano modificado, funcionalización enzimática, propiedades viscoelásticas, capacidad antioxidante, películas o recubrimientos.

ABSTRACT

Currently, there is a growing interest in sustainable polymers particularly in basic applications such as packaging, edible films and coatings which biodegrade under controlled conditions of storage in order to alleviate the growing global synthetic materials waste problem. In this regard, the chitosan and its derivatives have demonstrated great potential as biological packaging material due to its inherent antimicrobial power, non-toxic characteristics, film-forming material as well as their versatile physical and chemical properties as several researchers have highlighted in recent reviews.

As a result of the interest in this biomacromolecule, a wide range of chitosan-based materials have been proposed by means of suitable chemical or enzymatic modifications onto the polymer backbone to improve its solubility in water, antimicrobial properties, flocculant capacity, absorbency and adhesiveness, while remaining biodegradable and biocompatible for potential applications in biomedicine, food or water treatment. Chemical modifications mainly consisted in the insertion of small functional groups such as alkyl, carboxymethyl, saccharides or oligosaccharides for increasing the Ch solubility at neutral and alkaline pH without affecting its cationic character. Other compounds like cyclodextrins, and acids, such as p-aminobenzoic, lactobionic, sialic and polyacrylic have also been attached to confer removal capacity of textile dyes, drug delivery, wound healing, inhibition of microorganisms, antioxidant capacity and increasing hydrophilicity. Despite of the possibility to modify chitosan by chemical means, enzymatic modifications offer alternative routes, especially in products to be applied in foodstuffs due to minimized hazards associated with toxic reagents, in addition to mild and environmentally friendly reaction conditions.

The enzyme grafting of hydrophobic alkyl side chains onto Chitosan has been successfully achieved in the present work using octyl gallate and horseradish peroxidase as biocatalyst.

The chemical structures of the octyl gallate-grafted Ch were corroborated by ATR-FTIR, ¹HMRN, ζ potential, and amino group content. The properties of the resulting materials have been studied by rheology, Intrinsic viscosity, antioxidant capacity by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy and antimicrobial activity in order to envisage its potential applications. The antioxidant capacity of materials determined by EPR shows that in functionalized chitosans, the radical scavenging increases with grafting, which was related to the aromatic ring in the octyl gallate. The chitosan with the highest grafting exhibited an antioxidant capacity of 81%. The amino groups increased with the grafting degree, which is related to the antimicrobial activity. Solutions of the materials in acetic acid and lactic acid exhibited a shear-thinning flow behavior which also increased with the grafting. The viscoelastic properties of solutions were characterized by oscillatory shear measurement and the result showed fluid-like viscoelastic behavior. The elasticity of the solutions decreased with the plasticizer addition. The chitosan with a higher grafting degree in acetic acid solution displayed the best viscoelastic properties that offer structure and stability which are desirable for the development of films or coatings. The derivatives exhibited fungicidal activity *in vitro* against the phytopathogenic fungi *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Additionally, edible films were prepared from chitosan-co-octyl gallate and characterized by gas barrier, mechanical and topological properties. Topologically edible films based on QOG2 and QOG2 glycerol has a slightly rough and porous structure, this was reflected in the increase of the mechanical and gas barrier properties, tensile strength, elongation percentage and water vapor permeability (10.33 ± 0.06 kPa, 4.11 ± 0.09 % y $6.35 \pm 0.38 \times 10^{-4}$ g mmh⁻¹m⁻² kPa⁻¹). Regarding to the edible films it was found that the velocity of weight loss decreased compared to the control, the weight loss of the coated Anjou pears was 2%, while for the Ataulfo mangoes weight loss was 8%.

Keywords: modified chitosan, enzymatic functionalization, viscoelastic properties, antioxidant capacity, films or coatings.

ÍNDICE GENERAL

I INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	3
2.1 <i>Películas y recubrimientos</i>	3
2.1.1 Componentes para la formulación de películas y recubrimientos comestibles	4
2.1.2 Aditivos en la formulación de las películas comestibles.....	5
2.1.3 Preparación y formación de películas	6
2.2 <i>Caracterización de las soluciones formadoras de película</i>	8
2.2.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹ HRMN)	9
2.2.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada ATR-FTIR	10
2.2.3 Potencial ζ	11
2.2.4 Viscosidad intrínseca.....	12
2.2.5 Resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	13
2.2.6 Reología	13
2.2.6.1 Propiedades viscoelásticas	16
2. 3 <i>Quitina</i>	17
2. 4 <i>Quitosano</i>	18
2. 4.1 Películas a base de quitosano.....	19
2. 4.2 Quitosano Modificado.....	21
2. 6 <i>Octil galato</i>	26
2. 7 <i>Capacidad antioxidante</i>	26
2.8 <i>Aplicación de recubrimientos con base en quitosano funcionalizado</i>	27
2.8.1 Mango Ataulfo	27
2.8.2 Pera D'Ánjou	28
III HIPÓTESIS.....	29
IV OBJETIVOS.....	29
V MATERIALES Y METODOLOGÍA	30

5.1 Materiales.....	30
5.2 Métodos	30
5.2.1 Síntesis del quitosano funcionalizado enzimáticamente	30
5.2.2 Caracterización del quitosano-co-octil galato.....	31
5.2.2.1. ATR-FTIR	31
5.2.2.2. Espectroscopía de resonancia magnética de protón (¹ H RMN).....	31
5.2.2.3 Análisis térmico	32
5.2.2.4 Potencial ζ.....	32
5.2.2.5 Determinación del contenido de los grupos amino por el método de ninhidrina .	33
5.2.2.6 Actividad antioxidante.....	33
5.2.2.6.1 Determinación espectrofotométrica.....	34
5.2.2.6.2 EPR	34
5.2.3 Caracterización reológica.....	35
5. 2.3.1 Viscosidad intrínseca.....	35
5.2.3.2 Viscosidad aparente	35
5.2.3.3 Propiedades viscoelásticas	36
5.2.4 Caracterización de películas	36
5.2.4.1 Preparación de soluciones formadoras de película.....	36
5.2.4.2 Propiedades mecánicas	36
5.2.4.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	37
5.2.5.4 Morfología por Microscopia electrónica de barrido (SEM)	38
5.2.5.5 Ángulo de contacto.....	39
5.2.5.6 Prueba antifúngica <i>in vitro</i> de de los quitosanos-co-octil galato en solución y de películas a base de quitosano nativo y quitosanos-co-octil galato contra <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	39
5.2.5.7 Esporulación.....	40
5.3 Aplicación de recubrimiento en frutos.....	40
5.3.1 Pérdida fisiológica de peso.....	41
5.3.2 Determinación de color.....	41
5.3.3 Firmeza de la fruta.....	41
5.3.4 Determinación de °Brix.....	42
5.4 Análisis estadístico.....	42

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
6.1 ATR-FTIR.....	43
6.2 ¹ H RMN, potencial ζ y aminos libres	44
6.3 Análisis termogravimétrico	47
6.4 Capacidad antioxidante.....	48
6.4.1 Método espectrofotométrico	48
6.4.2. EPR	49
6.5 Caracterización reológica.....	52
6.5.1 Viscosidad intrínseca.....	52
6.5.2 Curvas de flujo.....	53
6.6.2 Propiedades viscoelásticas	56
6.8 Caracterización de películas	58
6.8.1 Propiedades mecánicas	58
6.8.2 Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	60
6.8.3 Ángulo de contacto.....	61
6.8.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	62
6.9 Actividad antifúngica in vitro de quitosano nativo y quitosanos-co-octil galato en solución contra <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	65
6.9.1 Efecto antifúngico de las películas formadas en estudios in vitro de <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	66
6.9.2 Esporulación.....	68
6.10 Aplicación de recubrimiento a frutos	69
6.10.1 Pérdida fisiológica de peso.....	69
6.10.2 Determinación de color.....	72
6.10.3 Firmeza y °Brix de mangos	77
VII. CONCLUSIONES	79
IX RECOMENDACIONES	81
X REFERENCIAS.....	82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de desacetilación, grado de inserción, potencial ζ y contenido de grupos amino libres del quitosano nativo, QOG1 y QOG2.....	47
Cuadro 2. Viscosidad intrínseca y valores de la constante de Huggins del quitosano nativo, QOG1 y QOG2.	52
Cuadro 3. Índice de consistencia (k) y comportamiento de flujo (n) de soluciones de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 con y sin glicerol (Gli).	56
Cuadro 4. Propiedades mecánicas, de películas a base de quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol (Gli).	60
Cuadro 5. PVA y ángulo de contacto de películas a base de quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol.....	61
Cuadro 6. Esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en PDA y cubiertas a base de quitosano nativo, QOG1 y QOG2.....	69
Cuadro 7. Velocidad de pérdida de peso de los mangos recubiertos con las diferentes soluciones formadoras de película.	71
Cuadro 8. Velocidad de pérdida de peso de peras recubiertas con las diferentes soluciones formadoras de película.	72
Cuadro 9. Firmeza y °Brix de mango Ataulfo cubiertos con las diferentes soluciones con y sin Gli después de 6 días de almacenamiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ a 58 % HR.....	77
Cuadro 10. Firmeza y °Brix de peras cubiertas con quitosano nativo (Q_n), QOG2 con y sin glicerol a los 5 días de almacenamiento a 25°C y 56 %HR	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de vibraciones moleculares	11
Figura 2. Curvas de flujo de acuerdo con la relación entre el esfuerzo cortante y la deformación resultante.	14
Figura 3. Respuesta típica de un barrido de deformación mostrando la región viscoelástica lineal (Steffe, 1992).	17
Figura 4. Estructura molecular de la quitina	18
Figura 5. Estructura molecular del quitosano.	18
Figura 6. Posible mecanismo de inserción de moléculas de antioxidantes en la cadena del quitosano (García y Gimeno, 2010).	25
Figura 7. Estructura molecular del octil galato.....	26
Figura 8. Molécula objetivo de quitosano-co-octil galato.....	43
Figura 9. Espectro ATR-FTIR del quitosano nativo, QOG1 y QOG2.....	44
Figura 10. Espectro ¹ HRMN del a) quitosano nativo, b) QOG1 y c) QOG2.....	46
Figura 11. Termograma del quitosano nativo (Q _n), QOG1 y QOG2.	48
Figura 12. Porcentaje de inhibición del radical DPPH con el quitosano nativo (Q _n), quitosano-co-octil galato	49
Figura 13. Espectros EPR de soluciones metanólicas (1500 g/Kg de DPPH) de quitosano nativo, QOG1 y QOG2.	51
Figura 14. Curvas de flujo de soluciones de quitosano con diferente solvente. quitosano nativo (■); QOG1 _A (●); QOG2 _A (▲); Q _L (□); QOG1 _L (○); QOG2 _L (Δ). A, ácido acético; L, ácido láctico.....	54
Figura 15. Curvas de flujo de soluciones de quitosano con diferente solvente y glicerol. Quitosano nativo (■); QOG1 _A (●); QOG2 _A (▲); Q _L (□); QOG1 _L (○); QOG2 _L (Δ). A, ácido acético; L, ácido láctico.	54
Figura 16. Efecto del tipo de ácido en el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') como una función de la frecuencia oscilatoria de soluciones de quitosano y quitosano octil galato a 25 °C. Símbolos llenos G' y símbolos vacíos G'', Quitosano nativo _A (■); QOG1 _A (●); QOG2 _A (▲); Q _L (◆); QOG1 _L (►); QOG2 _L (*).A, ácido acético; L ácido láctico.....	57
Figura 17. Efecto del tipo de ácido y glicerol en el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') como una función de la frecuencia oscilatoria de soluciones de quitosano y quitosano-co-octil galato a 25 °C. Símbolos llenos G' y símbolos vacíos G'',	

Quitosano nativo _A (■); QOG1 _A (●); QOG2 _A (▲); Q _L (◆); QOG1 _L (▶); QOG2 _L (*).A, ácido acético; L ácido láctico.	58
Figura 18. Micrografías de superficie de películas sin glicerol a) quitosano nativo, b) QOG1, c) QOG2, y corte transversal d) quitosano nativo, e) QOG1, y f) QOG2.	63
Figura 19. Micrografías de superficie de películas con glicerol a) quitosano nativo, b) QOG1, c) QOG2 y corte transversal d) quitosano nativo, e) QOG1, y f) QOG2.	64
Figura 20. Crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> en medio PDA adicionado con soluciones de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 (0.75 g/L).	65
Figura 21. Efecto de soluciones de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 a concentración de 0.75 g/L sobre el crecimiento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	66
Figura 22. Efecto de películas elaboradas de quitosano nativo (Q _n), QOG1 y QOG2 con y sin plastificante sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	67
Figura 23. Efecto de películas elaboradas a base de quitosano nativo (Q _n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol sobre el crecimiento in vitro del <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	68
Figura 24. Pérdida de peso de mango Ataulfo recubiertos con quitosano nativo (Q _n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol.	70
Figura 25. Pérdida de humedad de pera D´Anjou recubiertas con quitosano nativo y QOG2 con y sin glicerol.	72
Figura 26. Parámetros de color de mangos recubiertos con las diferentes formulaciones después de 6 días de almacenamiento 25 ± 2°C y 58 % HR.	74
Figura 27. Circulo cromático L* a* b*, color de mangos, color de peras	75
Figura 28. Parámetros de color de las peras recubiertas con los quitosanos antes y después de los 5 días de almacenamiento a 25 °C y 56 %HR.	76

I INTRODUCCIÓN

En el envasado de alimentos se utiliza una amplia variedad de materiales que incluyen metales rígidos y flexibles, vidrio, plásticos flexibles, papel y películas, entre otros (McDowell, 2003). No obstante, el uso indiscriminado de empaques sintéticos ha generado serios problemas ecológicos contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja o nula degradación. Además efectos de toxicidad provocados por la migración de componentes de los empaques al alimento, en lo que se ha venido a llamar contaminantes emergentes, susceptibles entre otras de provocar disrupción endócrina, es algo que se viene apuntando como un problema grave de salud a nivel mundial (Casas et al., 2013; Roberts, 2012). Todo esto ha motivado la búsqueda o generación de materiales con base en biopolímeros o derivados de éstos, convirtiéndose en una excelente opción para el desarrollo de productos biodegradables libres de toxicidad (Bastioli, 2001; Belalia y col, 2008).

Se ha reportado que la combinación de materiales sintéticos y naturales (biopolímeros) mediante el entrecruzamiento o inserción de moléculas sobre el esqueleto de un polímero (co-polimerización o funcionalización) constituyen una forma novedosa de generar materiales en forma de películas, recubrimientos o envases eficientes para un propósito de uso con propiedades de degradación amigables con el medio ambiente (Krochta, 1992; Tharanathan, 2003).

Bajo este contexto, el quitosano ha adquirido una especial importancia ya que se trata de un polisacárido natural policatiónico derivado de la quitina, que es biocompatible, no tóxico, degradable naturalmente, posee actividad antimicrobiana y antifúngica, así como propiedades físicas y químicas versátiles. Además, su disponibilidad es amplia debido a que la quitina de donde se obtiene es el segundo polímero más abundante en la naturaleza y el proceso de producción permite generar quitosanos con diferente grado de desacetilación y peso molecular (Sashiwa y Aiba, 2004; Alves y Mano, 2008; Dutta, y col., 2009; Vinsová y Vavříková, 2011).

Cabe señalar que una de las propiedades naturales destacadas de este polímero es su capacidad filmogénica, debida a su propiedad catiónica que permite establecer interacciones electrostáticas entre sus cadenas (Chenite y col., 2001; Rinaudo, 2006; Teotia y col., 2012),

aunado a su actividad antimicrobiana y su acción como promotor de la cicatrización de heridas, tiene amplio potencial de aplicación en biomedicina. En el campo de la agricultura, se emplea principalmente como aditivo en fertilizantes dada su función como biocida y bioestimulante; en el tratamiento de aguas, ha encontrado su mayor aplicación como agente quelante, floculante y coagulante; finalmente, en el área de alimentos su utilización abarca la clarificación de bebidas, como espesante, así como ingrediente principal en formulaciones multicomponentes de películas y recubrimientos. Todas estas propiedades están relacionadas con la presencia de grupos amino terminal. (Wong y col., 1992; Park y col., 2002 ; Xu y col., 2004; Mourya y col., 2008; Casariego y col., 2009 ; Abugoch y col., 2010; Vu y col., 2011).

Para el caso particular de la industria alimentaria, el quitosano tiene mayor potencial para ser empleado como matriz en la elaboración de películas y recubrimientos. Sin embargo, las películas obtenidas y reportadas hasta el momento son bastante higroscópicas lo que limita su uso. Para contrarrestar estas limitaciones y/o potenciar sus propiedades se han realizado funcionalizaciones químicas o enzimáticas. Entre los grupos empleados para funcionalizar al quitosano se encuentran sacáridos, oligosacáridos, grupos alquil, ciclodextrinas, ácidos orgánicos, hidroxipropilcelulosa, láctidos, poliláctido y polifenoles, lo que ha permitido obtener derivados de quitosano (quitosanos funcionalizados) con mejores características de solubilidad, (quitosano obtenido por carboximetilación); mayor actividad antimicrobiana,(quitosano cuaternizado); capacidad quelante, (entrecruzado con succinil), cualidades humectantes, (N-carboximetil quitosano); propiedades cicatrizantes, (quitosano con ácido p-azidobenzoico); entre otras (Kumar y col., 2004; Vinšova, y Vavřítová, 2011).

Las modificaciones mencionadas involucran reacciones químicas y/o enzimáticas, de éstas se prefieren las enzimáticas debido a su especificidad y a que no dejan residuos dañinos para el ser humano. En el caso de alimentos, por norma los empaques deben ser inocuos, en este sentido, con el presente trabajo se planteó como meta desarrollar un quitosano funcionalizado que conservara las propiedades filmogénicas, se incrementara la actividad antimicrobiana y se confiriera a la molécula en su conjunto una capacidad antioxidante como valor agregado.

II. MARCO TEORICO

2.1 Películas y recubrimientos

Una película o recubrimiento se concibe como una capa delgada de material, que puede ser comestible, aplicada sobre los alimentos ya sea por inmersión, rocío o como envoltura, para ofrecer una barrera selectiva a la transmisión de gases, vapores y solutos, ofreciendo también protección mecánica. Usualmente los recubrimientos son aplicados directamente y formados sobre la superficie de los productos, mientras que las películas se forman por separado como láminas u hojas delgadas y después se colocan sobre los productos (Gennadios y Weller, 1990).

Una propiedad relevante es que pueden funcionar como vehículo para la incorporación de otros ingredientes o aditivos (antioxidantes, saborizantes, antimicrobianos, pigmentos, etc.) con lo cual se pueden incrementar las propiedades funcionales y mejorar la integridad mecánica o características de manejo del alimento en cuestión. Las películas comestibles con buenas propiedades mecánicas pueden llegar a sustituir las películas de empaque sintéticas (Han, 2000; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997).

Para que las películas y recubrimientos comestibles puedan ser utilizados en alimentos deben reunir las siguientes características técnicas y propiedades funcionales (Biquet y Labuza, 1988; Kester y Fennema, 1986; McHugh y Krochta, 1994b).

a) Características técnicas

- Eficiencia mecánica y gran capacidad de barrera
- Suficiente estabilidad bioquímica, física y microbiológica
- Tecnología simple de fabricación y aplicación y bajos costos
- Buenas cualidades sensoriales
- No contaminante

b) Propiedades funcionales

- Libre de tóxicos y seguros para la salud

- Retardar la pérdida de humedad de los alimentos frescos o congelados. La importancia de esta función radica en que los niveles de actividad del agua (a_w) deben ser mantenidos en los alimentos de tal manera que exhiban una calidad óptima y seguridad aceptable (Avena-Bustillos y col., 1993).
- Retardar la transferencia de gases (O_2 , CO_2) con lo que se puede controlar la respiración y por tanto la maduración de productos vegetales o la oxidación de ciertos compuestos contenidos en el alimento. Se considera que crean una atmósfera modificada (El Ghaout y col., 1991).
- Retardar la migración de grasas y aceites o reducir la absorción de grasas durante el proceso de fritura de productos.
- Impartir integridad estructural a los alimentos y favorecen el manejo del mismo.
- Retener compuestos volátiles asociados con el sabor.
- Vehículos para la incorporar aditivos como los compuestos aromáticos (Debeaufort y Voilley 1995), antioxidantes (Lin y Zhao, 2007; Sánchez-González, y col., 2009), colorantes, sustancias nutritivas (Avena-Bustillos y col., 1993), iones y conservadores (Rico-Peña y Torres, 1991).
- Permitir la separación de piezas o dosis específicas contenidas en un mismo envase facilitando de esta manera su consumo.
- Retardar o prevenir el crecimiento microbiano durante el almacenamiento.

2.1.1 Componentes para la formulación de películas y recubrimientos comestibles

Los componentes mayoritarios de las películas y recubrimientos pueden dividirse en tres categorías: hidrocoloides, lípidos y compuestos. Los hidrocoloides incluyen proteínas y polisacáridos; entre los primeros se encuentran la gelatina, caseína, proteína de soya, proteína de suero de leche, glúten de trigo; dentro de los segundos se encuentran derivados de celulosa, alginatos, pectinas, almidones y otros polisacáridos. Los lípidos incluyen ceras, acilgliceroles y ácidos grasos.

Las formulaciones usualmente se preparan con mezclas de los componentes anteriormente mencionados y se les conoce como multicomponentes (Krochta y col., 1994). La selección de dichos materiales estará en función de las características que se desean obtener en una formulación para brindar la protección y funcionalidad al alimento al cual se pretende aplicar, así también es necesario establecer la proporción y concentración de los componentes

acorde con la compatibilidad entre ellos, lo cual hace que el desarrollo de formulaciones se convierta en una actividad tecnológica con importante atención en el producto de consumo final (Chen y col., 2003, Krochta y col., 1994).

2.1.2 Aditivos en la formulación de las películas comestibles

Además de los componentes principales, son varios los materiales que pueden incorporarse en las formulaciones para conseguir otras propiedades funcionales en las películas terminadas, entre los más usuales se encuentran los que se describen a continuación.

Plastificantes. Se adicionan para mejorar las propiedades mecánicas en las películas. Son compuestos de bajo peso molecular que se introducen en la cadena del polímero induciendo un debilitamiento de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas adyacentes debido al incremento de la fracción volumen o movilidad molecular de polímeros; el resultado se refleja en una mayor flexibilidad de la película o recubrimiento polimérico (Kester y Fennema, 1986; Shaw y col., 2002). Los agentes plastificantes de grado alimentario más comunes son los polioles como el glicerol, sorbitol, manitol, sacarosa, propilenglicol y polietilenglicol. Para obtener beneficios óptimos de un plastificante, éste debe ser compatible con el polímero, es decir debe tener una estructura química y fuerzas intermoleculares similares que le permita asociarse y ser miscible con el polímero (Greener y Fennema, 1994; Sothornvit, y Krotcha, 2000).

El glicerol es uno de los plastificantes más empleados en la elaboración de películas, debido a su estabilidad y compatibilidad con moléculas poliméricas hidrofílicas (Fernández Cervera y col., 2004).

Es importante señalar que aun cuando las películas y recubrimientos comestibles constituyen vehículos eficaces para la incorporación de aditivos, siempre existe la posibilidad de que su adición pueda alterar adversamente las propiedades de resistencia al vapor de agua, gases o transporte de solutos. Cabe destacar que además de su eficacia como barrera, las películas y recubrimientos comestibles tienen también que ser inocuos y biodegradables, así como sensorial y funcionalmente compatibles con los productos cubiertos.

Las investigaciones reportadas indican que la selección de una sustancia formadora de película y del aditivo selectivo o activo está en función del objetivo, la naturaleza del producto y el método de preparación y aplicación (Kester y Fennema, 1986; Debeaufort y col., 1998). Dado que las propiedades de las diferentes sustancias pueden aprovecharse, es común elaborar formulaciones compuestas para obtener películas o recubrimientos con estructura heterogénea.

Surfactantes. Son compuestos orgánicos anfílicos que disminuyen la tensión superficial entre la fase dispersa y la continua ya que cuanto menor es la tensión interfacial entre las dos fases de una emulsión, tanto más fácil es la emulsificación.

Los surfactantes se dividen en iónicos y no iónicos. El surfactante iónico consta de un grupo lipófilo orgánico y un grupo hidrófilo. Los surfactantes iónicos se subdividen en aniónicos y catiónicos, según sea la naturaleza del grupo activo.

Los emulsificantes son moléculas superficialmente activas que se adsorben en la superficie de las gotas, formando una membrana protectora que retarda la aproximación de las gotas y su agregación, fomenta la formación de la emulsión y estabilización a corto plazo por acción interfacial (Valencia-Chamorro y col., 2011).

Previenen la fractura de la película sobre el alimento, reducen la actividad de agua de las películas y la velocidad de pérdida de humedad en el producto, incluye grasas y aceites.

2.1.3 Preparación y formación de películas

Las sustancias formadoras de películas crean una estructura continua mediante interacciones entre moléculas, bajo la acción de un tratamiento químico o físico. La mayoría de las formulaciones deben contener al menos un componente capaz de formar una matriz estructural (red) con suficiente cohesividad (proteína, o polisacárido). Se ha reportado que la fuerza cohesiva de la película está asociada a la química y estructura del polímero, así como al tipo de solvente, presencia de agentes plastificantes y condiciones ambientales durante la formación de la película. Una mayor cohesión estructural genera una menor flexibilidad,

menor porosidad y menor permeabilidad a gases, vapores y solutos sólidos. Conforme aumenta la longitud y polaridad de la cadena del polímero, se incrementa la cohesividad; si además existe una distribución uniforme de los grupos polares a lo largo de la cadena del polímero, la probabilidad de formación de enlaces dipolo dipolo por puente de hidrógeno intercatenarias es mayor y por consiguiente también la cohesión (Kester y Fennema, 1986).

La formación de una película o recubrimiento involucra uno de los siguientes procesos (Guilbert y col., 1996; Debeaufort y col., 1998):

- a) La coacervación. La película se forma mediante la separación del material polimérico de la solución ya sea por calentamiento, alteración de pH, adición de solventes, o alterando la carga del polímero. La coacervación puede ser simple o compleja. En la simple solamente un polímero es tratado. En la coacervación compleja, al menos dos macromoléculas de carga opuesta se combinan para producir una mezcla de polímeros insolubles por el mecanismo de neutralización de carga.
- b) La eliminación del disolvente. La formación de una película sólida se lleva a cabo mediante la evaporación del solvente en el que se encuentra disuelto o disperso el polímero. Para obtener una película con propiedades mecánicas adecuadas es necesario ajustar la temperatura y velocidad de secado.
- c) La fusión y la solidificación empleadas en las películas de naturaleza lipídica. Consiste en el calentamiento de la sustancia empleada por encima de su punto de fusión y su posterior enfriamiento (Greener y Fenema, 1994).

Los recubrimientos y películas desarrollados con la combinación de sustancias hidrofóbicas y sustancias hidrofílicas se formulan como emulsiones que se aplican en forma fluida a los alimentos que protegen y se secan "*in-situ*" para formar recubrimientos sólidos alrededor de los alimentos (Bosquez, 2003; Ruiz-Ramos, 2004). También pueden aplicarse como bicapa, en la cual una capa es un hidrocoloide y la otra un lípido, o como un conglomerado, donde los componentes lipídicos y el hidrocoloide están intercalados en toda la película (Krochta y col., 1994).

Cualquiera de los procesos de formación de películas se puede utilizar con variadas técnicas de aplicación. Sin embargo, el modo de aplicación de una película comestible depende en gran medida del tipo de producto que se desee recubrir (Soliva y Martín, 2001).

En el caso de alimentos que requieran una capa uniforme en una superficie irregular, la inmersión es la técnica que proporciona mejores resultados. Ésta técnica es la más utilizada en el recubrimiento de frutas, vegetales y productos cárnicos. En el caso de frutas y verduras, la inmersión se realiza en tanques que contienen las formulaciones formadoras de cubiertas. Posterior a esto se realiza un escurrido y secado, dejando que una película delgada se forme sobre la superficie del producto (Greener y Fenema, 1994, Tharanathan, 2003; Aguilar, 2005).

La aplicación de películas por aspersion puede formarse de manera más uniforme que aquella aplicada por inmersión. La aspersion, es el método convencional usado generalmente en mucho de los casos. Debido a la alta presión (60-80 psi) un menor gasto de solución formadora de película es requerido para obtener recubrimientos uniformes (Tharanathan, 2003).

En la técnica de “casting” o vaciado, la solución formadora de película es esparcida con un aplicador de grosor controlado en la superficie del producto y posteriormente secada. El recubrimiento es simple y permite controlar el espesor de la película sobre superficies planas y lisas (Greener y Fenema, 1994).

2.2 Caracterización de las soluciones formadoras de película

Los derivados obtenidos necesariamente requieren ser evaluados en términos de los cambios producidos en la estructura de la molécula para conocer el impacto de ello en las propiedades funcionales resultantes y poder predecir su aplicación. Dentro de los métodos empleados para la caracterización se encuentran los listados a continuación:

2.2.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹HRMN)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica no destructiva, se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética de la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 900 MHz. En esta técnica están implicados los núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ¹H, ¹³C, ¹⁹F, ¹⁵N y ³¹P, entre otros. Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. Cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β .

Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN.

La RMN es empleada para elucidar estructuras de especies químicas, también para determinar cuantitativamente de las especies absorbentes.

Los ensayos se realizan en solución con muestras solubles en disolventes deuterados para evitar que los hidrógenos del disolvente interfieran en la medición, o bien se puede realizar RMN en estado sólido para muestras insolubles, aunque este último adolece de mucha menor resolución y solamente es aplicable a la práctica a ¹³C-RMN (Fessenden y Fessenden, 1983; Skoog y col., 1995; McMurry, 2000).

2.2.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada ATR-FTIR

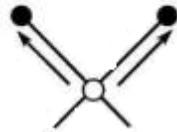
La espectroscopia de IR es una técnica que se emplea en la determinación cuantitativa y cualitativa de especies moleculares de todo tipo. La región más utilizada es la del infrarrojo medio que se extiende entre aproximadamente 670 y 4000 cm^{-1} . En esta región, para los análisis cuantitativos y cualitativos, se emplean los espectros de absorción, reflexión y emisión.

Dependiendo del rango de energía de la radiación que sea utilizada, la interacción con el material será de diferente naturaleza. Al absorber la radiación infrarroja las moléculas pueden cambiar su estado de energía vibracional y rotacional. En el caso de muestras sólidas y líquidas, sólo se tienen en cuenta los cambios entre estados de energía vibracional lo que hace posible la caracterización de los principales grupos funcionales de la estructura molecular del compuesto.

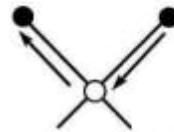
Existen dos tipos de vibraciones moleculares principales: tensión y flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión. Los distintos tipos de vibraciones se representan esquemáticamente en la Figura 1.

La espectroscopia de reflectancia total atenuada es una técnica que permite la obtención de espectros de infrarrojo de muestras que presentan alguna dificultad, como sólidos de limitada solubilidad, películas, fibras, pastas adhesivos, polímeros gomos y polvos (Skoog y col., 1995).

Vibraciones de tensión

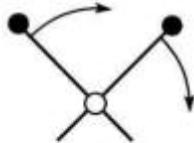


Simétrica

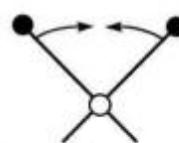


Antisimétrica

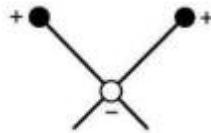
Vibraciones de flexión



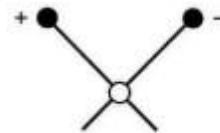
Balanceo en plano



Tijereteo en plano



Aleteo fuera del plano



Torsión fuera del plano

Figura 1. Tipos de vibraciones moleculares

2.2.3 Potencial ζ

La medición del potencial zeta es una técnica que proporciona la información suficiente de la distribución de carga superficial en la interfase sólido/agua (Mantilla y col., 2008).

Las partículas tienden a tener una carga inherente la cual adquieren en cualquier sistema. Esta carga influencia la forma en que las partículas interactúan, es decir, como se van a repeler o atraer.

Las partículas interactúan a cierta distancia de la superficie, la cual es llamada capa de deslizamiento (slipping plane) y aquí es donde el potencial zeta es medido.

El líquido que rodea a la partícula está en dos partes; la región interna (capa de Stern) en donde los iones están fuertemente ligados y la región externa (capa difusa) en donde están menos firmes.

Dentro de la capa difusa es en donde se mide el potencial zeta (valencia y todos los iones que se difunden con la partícula e Interactúan como una sola entidad).

2.2.4 Viscosidad intrínseca

La viscosidad es una de las propiedades más importantes de las soluciones poliméricas. La viscosidad depende de la estructura química del polímero, de las interacciones con el disolvente y del peso molecular. Normalmente, una molécula de alto peso molecular en un buen disolvente adquiere un gran volumen hidrodinámico y la viscosidad de la solución aumenta. En el caso de los polielectrolitos, el volumen hidrodinámico depende, no sólo del peso molecular, sino también del número y distribución de grupos iónicos en la cadena del polímero. Los grupos iónicos pueden causar repulsión entre las cadenas, lo cual da lugar a una expansión de la molécula y, en consecuencia, un incremento de la viscosidad de la solución.

La viscosidad intrínseca es una medida del volumen hidrodinámico de la molécula del biopolímero en la solución, está relacionada con el peso molecular y el radio de giro.

Las ecuaciones más comunes para evaluar la viscosidad intrínseca son las ecuaciones de Huggins y Kraemer, dadas por las ecuaciones 1 y 2 (Bastos y col. (2010)).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_1 [\eta]^2 C \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\frac{\ln \eta_r}{C} = [\eta] + k_1 [\eta]^2 C \quad (\text{Ec. 2})$$

donde η_{sp} es la viscosidad específica, C la concentración de la solución, $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, η_r la viscosidad relativa y k_1 es la constante de Huggins.

2.2.5 Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

La EPR (por sus siglas en inglés) o resonancia de espín electrónico es una técnica espectroscópica sensible a electrones desapareados. Esto es, generalmente, un radical libre, para moléculas orgánicas o un ion de un metal de transición, si es un compuesto inorgánico. Los principios físicos de esta técnica son análogos a los del RMN, pero se excitan espines electrónicos, en lugar de nucleares. La energía de interacción con el campo magnético de los electrones es mucho mayor que la de los núcleos, de forma que se usan campos magnéticos externos más débiles, y frecuencias electromagnéticas más altas. En un campo magnético de 0.3 T, la resonancia de espín electrónico ocurre alrededor de 10 GHz (Skoog y col., 1995).

2.2.6 Reología

El conocimiento de las propiedades de flujo de las soluciones formadoras de películas tiene importancia especial en ingeniería, ya que con esta información se puede diseñar e instrumentar la tecnología para su formulación, transporte, procesamiento y almacenamiento; además, provee de información muy valiosa para determinar la estabilidad y microestructura de los sistemas dispersos, así como conocer el grado de adhesividad, cohesividad, estructura, tamaño molecular e interacción molecular (Rao, 1999).

Por ejemplo Cuq y col., 1995 reportaron que a viscosidades altas o estructuras tipo gel de las soluciones formadoras de película dificulta la eliminación de burbujas de aire y la extensión de la solución para formar una capa delgada. También se ha reportado que para obtener un recubrimiento sobre una superficie sólida, la viscosidad de las soluciones formadoras de película deben presentar una viscosidad y esfuerzo a la tensión lo suficientemente altas para evitar el desplazamiento por efecto de la gravedad pero lo suficientemente bajo para permitir la nivelación por capilaridad (Peressini y col., 2003, García y col., 2009, Silva-Weiss, y col., 2013).

Existen dos tipos de fluidos: Los Newtonianos que poseen una relación lineal entre la magnitud del esfuerzo cortante aplicado (τ) y la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) resultante, son fluidos que contienen moléculas pequeñas (agua, metanol, etanol, etc.) y los fluidos no

Newtonianos en los cuales la relación entre el esfuerzo y el gradiente de velocidad es no lineal y diversa (Figura 2), en este caso se trata de fluidos que poseen moléculas de mayor tamaño (disoluciones de polímeros, polímeros fundidos, emulsiones, suspensiones) que exhiben diferentes tipos de comportamiento:

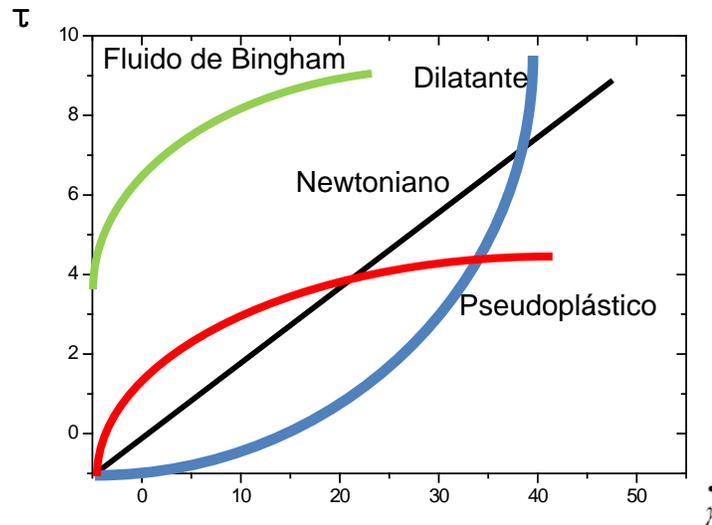


Figura 2. Curvas de flujo de acuerdo con la relación entre el esfuerzo cortante y la deformación resultante.

Fluidos pseudoplásticos o fluidificación por cizalla (shear-thinning): son fluidos en donde la viscosidad disminuye al aplicarse un aumento en el esfuerzo de corte. Ejemplos de este tipo de fluidos son emulsiones, asfaltos a determinadas temperaturas, polímeros. Son aquellos que siguen la denominada ley de la potencia u Ostwald De Waele.

$$\eta = K \dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. 3})$$

donde η es la viscosidad aparente, K el índice de consistencia y n el comportamiento de flujo ($n < 1$).

Dilatantes o espesamiento por cizalla (shear-thickening), la viscosidad aumenta a medida que aumenta el esfuerzo de corte aplicado. Algunos ejemplos de este tipo de fluido son harina de maíz disuelta en agua, disoluciones de almidón muy concentradas.

La ecuación matemática que describe un comportamiento dilatante es la ley de la potencia siendo $n > 1$.

Plástico de Bingham: se comportan como un sólido en condiciones estáticas requiriendo un esfuerzo mínimo (τ_0) para comenzar a fluir, comportándose como newtonianos a valores superiores de ese esfuerzo mínimo. Este modelo es aplicable al comportamiento de fluidos como plásticos, emulsiones, pinturas, lodos de perforación, mantequilla, y mayonesa.

La ecuación que modela este comportamiento de fluidos es la ecuación generalizada de Bingham:

$$\tau = \tau_0 + \eta \dot{\gamma} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde τ es el esfuerzo de corte aplicado

τ_0 , es el esfuerzo de fluencia o de deformación inicial.

$\dot{\gamma}$, es la tasa de corte

η , es la viscosidad aparente

De acuerdo con su comportamiento, respecto al tiempo, los fluidos no newtonianos pueden clasificarse en:

Tixotrópicos, disminuye la viscosidad a medida que aumenta el tiempo cuando están sometidos a un esfuerzo de corte constante, recuperando su estado inicial después de un reposo prolongado. Dentro de este tipo de fluidos se encuentran tintas de imprenta, suspensiones arcillosas, coloides, yogurt, entre otros.

Reopécticos o anti-tixotrópicos, aquí la viscosidad aumenta a medida que transcurre el tiempo a velocidad de corte constante, como se observa en la arcilla bentonítica, el yeso, la clara de huevo y la crema batida (Muller, 1973; Rao, 1999; Maestro, 2002).

2.2.6.1 Propiedades viscoelásticas

Los materiales exhiben un comportamiento viscoelásticos, con características de un sólido elástico y un líquido viscoso. Cuando la deformación de estos materiales es lo suficientemente pequeña, se presenta un comportamiento elástico lineal, en el que la medición de las propiedades son independientes de la magnitud del esfuerzo o deformación aplicada y se define a dicha región como región viscoelástica lineal (Figura 3).

El comportamiento viscoelástico de fluidos puede ser determinado por pruebas dinámicas oscilatorias en las que se determinan el módulo elástico o de almacenamiento (G'), y el módulo viscoso o de pérdida (G''). El módulo de almacenamiento expresa la magnitud de la energía que está almacenada; mientras que el módulo de pérdida es una medida de la energía que es perdida como disipación viscosa por ciclo de deformación.

El barrido de frecuencia es la forma más común de pruebas oscilatorias ya que éste muestra como el comportamiento viscoso y elástico del material cambia con la velocidad de aplicación del esfuerzo o deformación. En este tipo de prueba, la amplitud del esfuerzo o deformación aplicado a la muestra permanece constante mientras que la frecuencia se incrementa (Gunasekaran y Mehmet, 2000, Rao, 1999; Cho y col., 2006).

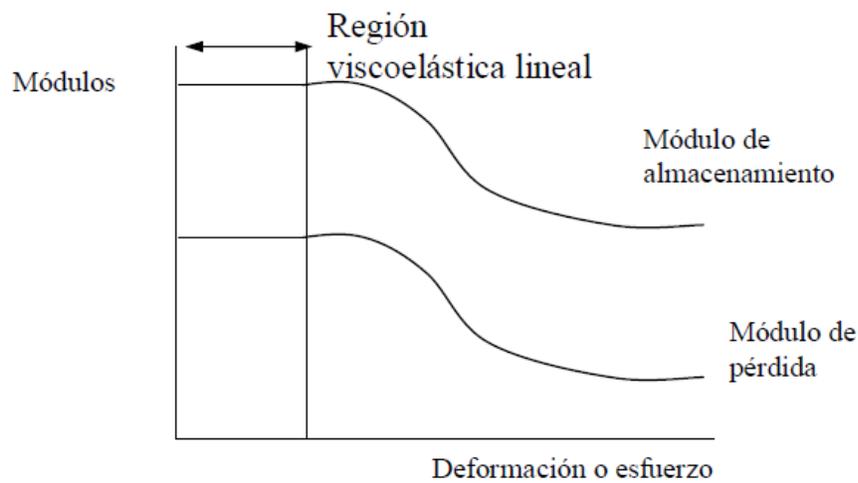


Figura 3. Respuesta típica de un barrido de deformación mostrando la región viscoelástica lineal (Steffe, 1992).

2. 3 Quitina

La quitina (Figura 4) es el compuesto más importante del exoesqueleto de los invertebrados, como por ejemplo, anélidos, caparazón de crustáceos (camarón, cangrejos, langosta), alas de insectos, moluscos, y también de hongos y mohos. Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Synowiecki y Khateeb, 2003).

Químicamente, el polisacárido está constituido de unidades de *N*-acetilglucosamina enlazadas por uniones β (1 \rightarrow 4). El monómero de la quitina es 2-acetoamida-2-deoxi- β -D-glucosa (Matsumoto y col., 1996; Dutta y col., 2009).

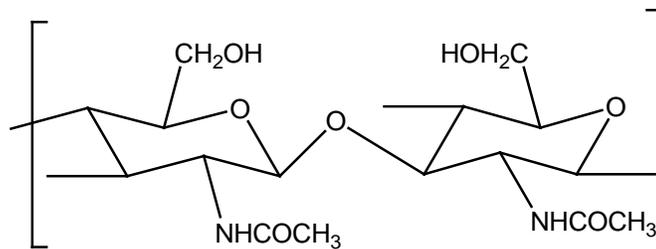


Figura 4. Estructura molecular de la quitina

La quitina es altamente hidrofóbica, insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos, es un producto ligero en polvo o copos, de color blanco a amarillento, no tóxico y biodegradable que puede ser procesado en múltiples derivados (Dutta y col., 2002).

2. 4 Quitosano

El quitosano (Figura 5) es un polisacárido catiónico con alto peso molecular, está compuesto por unidades de glucosamina con uniones β (1 \rightarrow 4), se obtiene por la desacetilación alcalina de extractos de quitina (No y col., 2002; Coma y col., 2002).

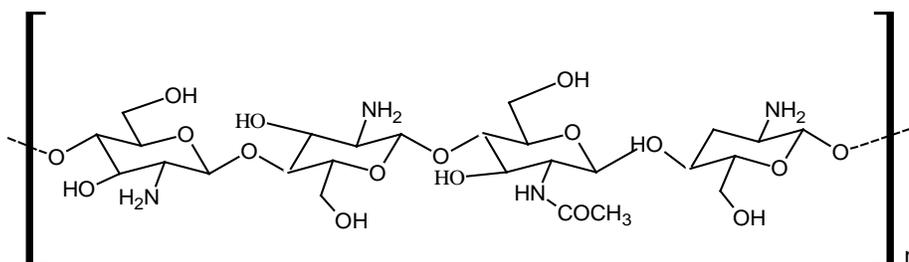


Figura 5. Estructura molecular del quitosano.

Es un polímero no tóxico, biocompatible, biodegradable, insoluble en agua y en soluciones alcalinas, es soluble en la mayoría de los ácidos orgánicos acuosos como el ácido acético, fórmico, tartárico y cítrico, entre otros (Bangyekan y col., 2006; Mathew y Abraham, 2008, Chillo y col., 2008), también presenta propiedades antimicrobianas y antioxidantes. A nivel comercial, se puede conseguir con diferentes grados de desacetilación y pesos moleculares, lo cual está directamente relacionado con sus diferentes propiedades funcionales. De hecho, la funcionalidad antimicrobiana, de solubilidad y formadora de película del quitosano

depende tanto del grado de desacetilación como del peso molecular utilizado (Siripatrawan y Harte, 2010).

El quitosano y sus derivados presentan actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans* (Coma, y col., 2003; Tsai, y col., 2002, Tripathi y col, 2010; Vinšova y Vavřítová, 2011), también presenta actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Sebti, y col., 2005; Vargas, y col., 2006; Bautista-Baños y col., 2003; Bautista-Baños y col., 2004, Martínez-Camacho y col., 2010).

El quitosano es utilizado en diversas áreas como en procesamiento y conservación de alimentos, cosmética, tratamiento de aguas, purificación de agua, cicatrización de heridas, reparación de tejidos, liberación de drogas y genes, y en agricultura (Wong y col, 1992; Park y col., 2002; Lavertu y col., 2003; Xu y col., 2004; Mourya y col., 2008; Casariego y col., 2009; Abugoch y col., 2010; Vu y col., 2011).

2. 4.1 Películas a base de quitosano

El quitosano forma cubiertas semi-permeables, claras, resistentes, flexibles con buenas propiedades de barrera al oxígeno. Por su carácter catiónico ofrece la oportunidad de elaborar envases con propiedades específicas debido a la interacción electrostática con numerosos compuestos.

Las películas a base de quitosano tienen un alto potencial para prolongar la vida de almacenamiento y controlar la senescencia y deterioro por pudriciones de muchos frutos frescos, tales como: durazno, fresa, litchi y uva (El Ghaouth, y col., 1991; Du, y col., 1997; Zhang y Quantick, 1997; Romanazzi, y col., 2002). Presenta propiedades antibacterianas y antifúngicas (Tharanathan, 2003). También se han desarrollado formulaciones a base de quitosano para emplearse en la liberación controlada de antioxidantes y de nutrimentos, drogas y sabores, contribuyendo de esta manera a la regulación de la tasa de respiración y la reducción del oscurecimiento enzimático en frutas (Broussignac, 1996; Nisperos-Carriedo,

1994; Cheng y col., 2003;; Casariego y col., 2009). Asimismo se han obtenido recubrimientos a base de quitosano para su aplicación en productos mínimamente procesados como por ejemplo en rodajas de mango, manzana y papaya para conservar su color, sabor original, y textura (Chien y col., 2007; Assis y Pessoa, 2004; Brasil y col., 2012)

El gran potencial que ofrecen las películas a base de quitosano se ha reflejado en diversas investigaciones por ejemplo, Park y col., (2002) evaluaron los efectos del peso molecular del quitosano y del solvente orgánico en las propiedades mecánicas y de barrera de películas de quitosano sin plastificante. Utilizaron quitosano de tres pesos moleculares (bajo, medio y alto) al 2 % y cuatro solventes ácido acético, ácido málico y ácido láctico al 2 % y ácido cítrico al 4 %. Estos autores llegaron a la conclusión de que las propiedades mecánicas y de barrera pueden controlarse eligiendo el peso molecular y el solvente adecuado y que las películas se pueden formular con propiedades adecuadas para ser utilizadas en el empaque de alimentos o medicamentos.

Las propiedades de barrera y mecánicas deseables de las películas a base de quitosano pueden conseguirse mediante la combinación con otros hidrocoloides. En este sentido, Peesan y col., (2005) y Xu col., (2005) mejoraron la permeabilidad a gases y las propiedades mecánicas de películas a base de quitosano preparando mezclas con almidón o con ácido poliláctico (PLA).

Por otro lado, Xu y col., (2004) desarrollaron películas de quitosano (grado de desacetilación 90 %) combinado con almidón regular de maíz (25 % de amilosa) o con almidón ceroso y evaluaron las propiedades mecánicas, resistencia al agua y compatibilidad de los materiales. Mientras que la WVTR de películas a base de quitosano nativo fue de 52.73 g/m²h, las formuladas con almidón de maíz y almidón ceroso exhibieron una WVTR de 46.45 g/m²h y de 47.83 g/m²h respectivamente. La diferencia se debe a la composición de ambos almidones, el almidón regular contiene 25 % amilosa que forma puentes de hidrógeno intermoleculares reduciendo la transferencia de vapor de agua. Por el contrario, el almidón ceroso contiene amilopectina, estructura ramificada, que por impedimento estérico disminuye la posibilidad de la formación de puentes de hidrógeno y como consecuencia aumenta la transferencia de vapor de agua.

En otro trabajo reportado por Casariego y col., (2009) determinaron el efecto combinado de la concentración de quitosano y arcilla en las propiedades de barrera, mecánicas, ópticas y térmicas de películas de quitosano que contenían micro/nanopartículas de arcilla para su posible aplicación en la industria de alimentos o farmacéutica. El valor de la permeabilidad al vapor de agua de las películas compuestas estuvo en función de la concentración del quitosano y la arcilla. La disminución de la PVA se atribuye a la presencia de capas de nanopartículas que impiden el transporte del vapor de agua a través de la película. El esfuerzo a la tensión de las películas incrementó al aumentar la concentración del quitosano mientras que para concentraciones altas de quitosano los valores del esfuerzo disminuyeron debido a la formación de puentes de hidrógeno entre el quitosano y las capas de silicato. En el 2010, Abugoch y col., caracterizaron películas comestibles a base de quitosano y proteína de quinoa sin el uso de plastificantes. Estas películas presentaron un porcentaje de elongación cuatro veces mayor que el de las películas de quitosano nativo (273.4 y 73.6 %), al mezclar los dos compuestos se establecen interacciones iónicas e hidrofóbicas entre ambos compuestos incrementando la extensibilidad, también la permeabilidad al vapor de agua de las películas incrementó significativamente de $3.8 \times 10^{-4} \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$ a $9.4 \times 10^{-4} \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$ este efecto está relacionado con el carácter hidrofílico y el espesor de las mismas.

2. 4.2 Quitosano Modificado

La presencia de grupos amino en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles, químicamente hablando, por lo que se ha estudiado la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones químicas y enzimáticas en la misma molécula, con el propósito de conseguir nuevas propiedades o potencializar las que posee de forma natural. En este contexto, ha sido posible la obtención de nuevos materiales de derivados de quitosano con propiedades adecuadas para aplicaciones en los campos de la biotecnología, industria alimentaria, cosmética y médica sin dejar de ser un producto biodegradable y biocompatible (Nyström y col., 1999; Kumar y col., 2004; Curcio y col. 2009).

Una de las reacciones que ha tomado importancia en las modificaciones del quitosano es la de inserción de grupos funcionales u otros polímeros que permite obtener materiales con propiedades deseables para potenciar su campo de aplicación. Recientemente, en este tipo

de reacciones se han empleado diversos iniciadores entre los que se encuentra la radiación y enzimas (Pillai y col., 2009; Olteanu, 2007)

Así por ejemplo, Knaul y col., (1999), mejoraron significativamente las características mecánicas del quitosano al entrecruzarlo químicamente con glioxal y/o glutaraldehído. Por otra parte, Fwu-Long, y col., (2006), consiguieron disminuir la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de quitosano cuando entrecruzaron este biopolímero con glutaraldehído y ácido aglicón-geniposídico. En este mismo estudio se observó que la actividad antimicrobiana del material no se vio afectada por el entrecruzamiento. Belalai, y col., (2008) modificaron quitosano para producir sales cuaternarias de amonio obteniendo polielectrolitos catiónicos solubles en agua, el N, N, N-trimetilquitosano (TMC), material que presentó actividad inhibitoria contra *Listeria innocua*.

Por otro lado, Vu y col., (2011) desarrollaron un recubrimiento biactivo comestible a base de quitosano funcionalizado por acilación con cloruro de palmitoil, con el objetivo de desarrollar recubrimientos comestibles activos a base de este material mezclados con limoneno, aceite de orégano y aceite de menta para evaluar la vida de anaquel de fresas. El recubrimiento a base de quitosano acilado con limoneno fue considerado el mejor recubrimiento para conservar fresa durante 10 días a 4 °C, sin afectar la apariencia y sin causar fitotoxicidad.

También se ha entrecruzado quitosano con aldehído, glucosa, maltosa y almidón dando como resultado derivados de quitosano con carbohidratos y aldehídos con buena capacidad de absorción de iones de metales para el tratamiento de aguas residuales (Sobahi y col., 2011).

Con la finalidad de incrementar la capacidad de adsorción de colorantes aniónicos Xiao-Yi y col., (2011) modificaron químicamente quitosano con etiléndiamina (EDA). El quitosano modificado exhibió estabilidad química en medio ácido y buena capacidad de adsorción de colorantes aniónicos eosin Y comparado con el quitosano nativo. Este polímero puede ser utilizado como adsorbente de bajo costo para remover colorantes aniónicos de aguas residuales y buen potencial para el tratamiento de efluentes.

Todas modificaciones mencionadas se refieren a modificaciones químicas, sin embargo, se han explorado también las modificaciones empleando enzimas. La experiencia hasta el

momento apunta a que las modificaciones enzimáticas tengan mayor preferencia debido a que las enzimas son específicas, no generan residuos dañinos para la salud y las condiciones de reacción son moderadas y amigables con el medio ambiente.

Se han reportado diversos trabajos de inserción enzimática de compuestos fenólicos a la molécula de quitosano utilizando tirosinasa, por ejemplo, Kumar y col. (1999) injertaron ácido clorogénico para obtener un derivado de quitosano soluble en condiciones básicas. En otro estudio reportado por Chao y col. (2004) injertaron enzimáticamente derivados fenólicos, tales como ácido 4-hidribenzoico (AB), ácido 3,4- dihidrobenzoico (DBA), ácido 3,4- dihidroxifenilacetico (PA) y ácido hidrocafeico (CA) al quitosano para conferirle la propiedad de adsorción de colorantes catiónicos. Sin embargo, el uso de esta enzima en la inserción de compuestos fenólicos tiene como limitante el no controlar las reacciones de o-quinonas, o aún la caracterización de los productos de reacción debido a que se obtienen derivados con arreglos de sustituyentes fenólicos monoméricos y oligoméricos (Kumar y col., 2000; Kumar y col., 1999).

En la búsqueda de enzimas apropiadas para la inserción de compuestos fenólicos a la molécula de quitosano se encontró que la peroxidasa de rábano (HRP) es una enzima con capacidad para insertar compuestos fenólicos. La HRP biocataliza la oxidación y polimerización acuosa de sustratos aromáticos incluyendo fenoles, bifenoles, anilinas, bencidinas en presencia de peróxido de hidrógeno. Los radicales fenoxi de esta reacción polimerizan espontáneamente para formar agregados insolubles en agua los cuales son separados fácilmente por sedimentación o filtración (Nicell, y col., 1995; Kobayashi e Higashimura, 2003).

En general, se sabe que las peroxidasas tienen como ventajas sobre la tirosinasa, su amplia gama de sustratos, así como el pH óptimo de su actividad que está entre 5 y 6, lo cual es sumamente conveniente en modificaciones del quitosano ya que éste solubiliza a pH's por debajo de 6.0.

Con base a lo anterior, Vachoud, y col., (2001) demostraron la capacidad de la HRP para injertar dodecil galato (DDG) a la molécula de quitosano mediante la generación de radicales a partir del derivado fenólico a los medios de reacción para formar enlaces estables, principalmente entre el grupo amino y carbonos aromáticos.

García y Gimeno, (2009), realizaron la modificación enzimática del quitosano utilizando HPR, para mejorar la capacidad antimicrobiana y antioxidante, adicionando ácido gálico (30 mM) y octil galato al quitosano en diferentes concentraciones (15 y 30 mM). Los resultados obtenidos indican que el quitosano-co gálico redujo el radical DPPH en un 55 %, mientras que los quitosano-co-octil galato 15 y 30 mM redujeron el radical en un 38 y 31 % respectivamente. Por otro lado, Itzincab-Mejía y col., (2013) reportaron que el quitosano de peso molecular medio injertado con octil galato (16.01 % molar) inhibió un 20 % el radical DPPH y presentó mayor efecto inhibitorio contra *E. coli* que contra *L. monocitogenes*.

En la Figura 6 se muestra el posible mecanismo de inserción de compuestos fenólicos a la molécula de quitosano propuesta por Curcio y col., (2009). En la etapa 1, los radicales hidroxilo, generados por la interacción entre el par redox, interaccionan con los átomos de hidrógeno en el α metileno, grupo hidroxilo del hidroximetileno o grupo NH_2 . En la etapa 2, el grupo hemo (co-factor) de la enzima nativa es oxidado en presencia de peróxido de hidrógeno a un intermediario enzimático. El estado intermediario de la enzima acepta una molécula del compuesto aromático dentro de su sitio activo y lleva a cabo su oxidación dando como resultado un radical libre, que es liberado a la solución dejando a la enzima en un estado llamado Eii. Esta forma de la enzima oxida a otra molécula del compuesto aromático liberando un segundo radical libre al seno de la solución y regresando a la enzima a su forma nativa. Este radical libre se combina espontáneamente para formar polímeros (Nicel y col., 1995; Kobayashi y col., 2001).

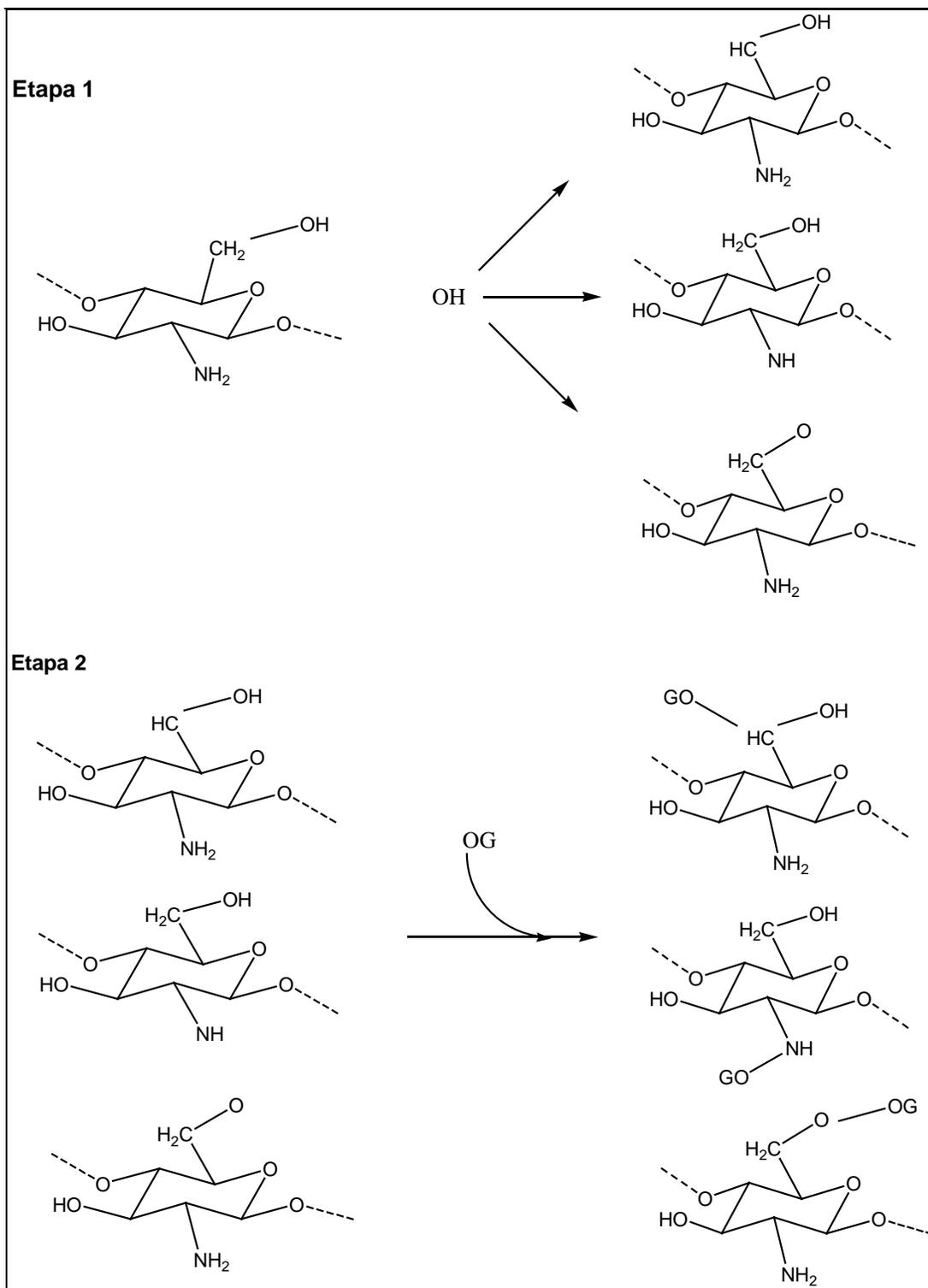


Figura 6. Posible mecanismo de inserción de moléculas de antioxidantes en la cadena del quitosano (García y Gimeno, 2010).

2. 6 Octil galato

El octil galato es un derivado fenólico que se obtiene de taninos de plantas, se ha utilizado como antioxidante en los alimentos a fin de evitar la reacción en cadena de la oxidación, eliminar el oxígeno atrapado o disuelto en un producto y fungir como agente quelante al eliminar las trazas de ciertos metales pesados como el hierro (García y Gimeno, 2010).

El octil galato es un antioxidante comercial, otros nombres que se le dan a este compuesto son galato de octilo, n-octil de 3, 4, 5-ácido trihidroxibenzoico, 3,4,5 octil trihidroxibenzoato (Figura 7), es insoluble en agua, soluble en etanol y éter, posee una cadena alquílica hidrofóbica y una parte hidrofílica (galato) (FAO, 1996, Hsu y col., 2009).

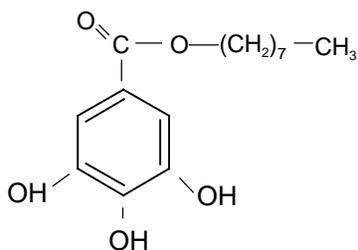


Figura 7. Estructura molecular del octil galato

Otra de las propiedades del OG es que posee un amplio espectro antimicrobiano, con actividad antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Zygosaccharomyces bailis* y *Aspergillus niger*. La actividad antifúngica se debe principalmente a la habilidad de actuar como surfactante no iónico. También es efectivo contra bacterias Gram-positivo incluyendo la cepa *Staphylococcus aureus* a la meticilina (Kubo, y col., 2001, 2002).

2.7 Capacidad antioxidante

Los antioxidantes se definen como compuestos que por su estructura química son capaces de impedir o prevenir la oxidación de distintas moléculas de importancia biológica, oxidándose ellos en su lugar (Kuskoski y col., 2005). Pueden inhibir o retardar la oxidación

de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios, o, por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, que se conocen como antioxidantes secundarios. Los antioxidantes primarios incluyen compuestos fenólicos, y se destruyen durante el período de inducción. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singulete (Gordon, 2001).

Los antioxidantes fenólicos son radicales libres terminales. Su actividad depende principalmente de su característica estructural tales como la energía de disociación del enlace O-H, deslocalización de la resonancia del radical fenol e impedimento estérico derivado de la sustitución de grupos voluminosos de hidrógeno en el anillo aromático (Sánchez-Moreno y col., 1998).

El poder antioxidante resulta primero de la capacidad de prevenir la auto-oxidación de radicales libres mediante la oxidación de sustratos a bajas concentraciones y segundo, que los radicales atrapados sean estables. Para definir la capacidad antioxidante se considera bajos tiempos aunado a bajas concentraciones, porque el tiempo de reacción es importante para definirla (Sánchez-Moreno y col., 1998).

2.8 Aplicación de recubrimientos con base en quitosano funcionalizado

Los recubrimientos o películas comestibles a base de quitosano se han utilizado para alargar la vida de anaquel de productos hortofrutícolas, ya que actúan como una barrera contra la pérdida de agua así como protección mecánica y antimicrobiana. Debido a que el quitosano funcionalizado obtenido presentó capacidad filmogénica, antimicrobiana atribuida a la presencia de los grupos aminos y capacidad antioxidante por la inserción del octil galato, este polímero se considera una alternativa para emplearlo en la conservación de frutos enteros, como son el mango y la pera.

2.8.1 Mango Ataulfo

México es uno de los grandes exportadores de mango debido a que se produce por un periodo de 8 meses al año. Los principales cultivares de mango son: Tommy, Atkins, Hadem,

Irvin, Sensation, Kent, Keitt y Golden Nugett. En los últimos años la variedad Ataulfo ha tenido gran aceptación en el mercado nacional y su volumen de exportación se ha incrementado, debido a sus características sensoriales. Se exporta a Estados Unidos, Canadá, España, Suiza y Francia. En el 2008 alcanzó un volumen de exportación de 31,416.4 toneladas. (SAGARPA, 2009, Siller-Sánchez y col., 2013; Infante y col., 2011).

El mango es un producto perecedero, posee una vida de anaquel corta. La vida de anaquel del mango se encuentra en el intervalo de 4 a 8 días a temperatura ambiente y de 2 a 3 semanas en frío 13 °C. Estos periodos de vida cortos limitan su transporte comercial a largas distancias. Además, las principales causas de pérdidas poscosecha de mangos son la fisiología normal de la fruta que produce importantes disminuciones en el peso, debido a la deshidratación, textura y apariencia, y el deterioro causado por hongos y plagas, por lo que se han realizado numerosos estudios para adecuar tratamientos, que aplicados poscosecha ayuden a prolongar la vida de anaquel. Una alternativa es el uso de películas o recubrimientos para mejorar la calidad y vida comercial.

2.8.2 Pera D´Anjou

Entre las principales variedades comerciales de pera (*Pyrus communis*) se encuentran las siguientes: Anjou, Bartlett, Bosc, Seckel, Kieffer (INFOASERCA, 2014, Snowdon, 1990).

En México, la pera Anjou es la de mayor demanda y la que alcanza mayor precio. Tiene una vida útil poscosecha de 3 a 10 días a una temperatura de 15.5 a 21 °C.

La pera es una fruta que posee una epidermis fina y delicada, de color verde claro aunque no cambia al amarillo a la madurez, con numerosas lenticelas bien visibles. La pulpa es blanco cremoso, de textura mantecosa y ligeramente granulada, aromática, jugosa, dulce ligeramente acidulada, calidad gustativa variable (Benítez, 2001).

III HIPÓTESIS

El desarrollo de formulaciones de quitosano funcionalizado enzimáticamente con octil galato permitirán obtener películas comestibles con propiedades de barrera, mecánicas, antimicrobianas y capacidad antioxidante para aplicarse en frutas frescas integrales.

IV OBJETIVOS

Objetivo General:

Sintetizar vía enzimática quitosano-co-octil galato para desarrollar y caracterizar recubrimientos comestibles funcionales.

Objetivos específicos:

Sintetizar enzimáticamente quitosano con octil galato y caracterizar el material obtenido mediante ¹HMRN, ATR-FTIR.

Determinar la capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana del material obtenido.

Determinar la viscosidad intrínseca, el efecto del plastificante así como el efecto del tipo y concentración del solvente sobre las propiedades reológicas y de estabilidad de dispersiones de quitosano-co-octil galato.

Elaborar películas comestibles a partir de dispersiones de quitosano-co-octil galato y caracterizar las propiedades de barrera, mecánicas, funcionales (actividad antimicrobiana), estructurales y morfológicas.

Determinar el potencial de aplicación de las películas que se obtengan en frutas frescas integrales.

V MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 Materiales

Quitosano nativo (PM 486.33 kDa; 87.2% de desacetilación), Octil galato (OG), Peroxidasa de rábano (HRP) Tipo II, Peróxido de hidrogeno (H_2O_2), Glicerol anhidro (Gli), ácido láctico (L), Oxido de deuterio (D_2O), alcohol metílico, 1,1-difenil-2-picril-hidracil (DPPH), ninhidrina y reactivo de ninhidrina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Acetona, hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), alcohol etílico y ácido acético glacial (A) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA).

Para la preparación de las soluciones se utilizó agua desionizada (Sistema de filtración Milli-Q).

5.2 Métodos

5.2.1 Síntesis del quitosano funcionalizado enzimáticamente

La síntesis se llevó a cabo siguiendo la metodología de Vachoud y col, (2001) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de quitosano nativo (Aldrich) de peso molecular medio al 1.6 % y adicionó gradualmente HCl 2 M para mantener el pH a 2.5. La solución de quitosano nativo se diluyó con buffer de fosfatos de sodio (0.1M pH 5.0) hasta obtener una concentración del polímero de 0.3%. Se ajustó el pH a 4.5 con NaOH 1 M. Una vez ajustado el pH se adicionó el octil galato previamente disuelto en acetona a concentración de 10 (QOG1) y 20 mM (QOG2). Posteriormente se adicionó la HRP por relación de peso. Adicionada la enzima se agregó lentamente el H_2O_2 al 5 % (v/v). Una vez terminada la adición del H_2O_2 se dejó reaccionar durante una hora. Transcurrido el tiempo, el polímero se purificó por precipitación desde el medio añadiendo una solución de NaOH (2 M) hasta alcanzar un pH de 7.0. Alcanzado el pH, se centrifugó a 7500rpm/20min a 20°C y se separó el sobrenadante. El precipitado se liofilizó durante 24 h y se almacenó para su posterior caracterización.

5.2.2 Caracterización del quitosano-co-octil galato

5.2.2.1. ATR-FTIR

Para corroborar que se llevó a cabo la inserción de octil galato a la molécula del quitosano nativo se obtuvieron espectros mediante ATR-FTIR en un Spectrum 100 FT-IR Spectrometer PerkinElmer, en un intervalo de longitud de onda de 650 a 4000 cm^{-1} , 20 escaneos. EL análisis se realizó en estado sólido, los polímeros obtenidos se molieron y tamizaron en un tamiz malla 140 μm .

5.2.2.2. Espectroscopía de resonancia magnética de protón (^1H RMN)

Para la caracterización del quitosano nativo y del quitosano-co-octil galato en sus dos concentraciones se disolvieron 10 μg de cada uno de los materiales obtenidos y del quitosano nativo como control en 1 mL de D_2O /DCI. Como estándar interno se usó trimetilsilano. Los espectros se obtuvieron en un equipo Bruker (AC 200) a 200 MHz.

El grado de desacetilación se determinó de acuerdo a la ecuación propuesta por Hirai y col., (1991) y el porcentaje de incorporación molar se determinó de acuerdo a la ecuación (5) y (6) respectivamente.

$$\% \text{ DDA} = \left\{ 1 - \left(\frac{\frac{1}{3} H_{\text{Ac}}}{\frac{1}{6} H_{2-6} - \left\{ 2 \times \left(\frac{I_{\text{alq}}}{15} \right) \right\}} \right) \right\} \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

$$\% \text{ molar} = \frac{\frac{I_{\text{alq}}}{15}}{\frac{I_{H_{2-6}} - \left\{ 2 \times \left(\frac{I_{\text{alq}}}{15} \right) \right\}}{6}} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

donde %DDA: Porcentaje de desacetilación; H_{Ac} : protones del grupo acetilo; H_{2-6} : protones H_2 , H_3 , H_4 , H_5 , y H_6 del quitosano; I_{alq} = la intensidad medida de la cadena alquílica de octil galato; 15= número de protones en la cadena alquílica del octil galato.

Al dividir la intensidad de la cadena alquílica entre el número de protones se obtiene la contribución de un solo protón de octil galato.

$I_{H_2-H_6}$ = intensidad de la señal de los seis protones del quitosano, teniendo en cuenta la corrección del CH_2 alfa del carbonilo que tiene una señal solapada en 4 ppm. (Hirai y col., 1991; Lavertu y col., 2003).

5.2.2.3 Análisis térmico

Se pesaron 3.5 mg de cada polímero y se determinó la temperatura de estabilidad térmica en un analizador térmico Du Pont Instruments, Calorímetro Diferencial de Barrido 910, en una atmósfera de nitrógeno, en un intervalo de temperatura de 25 a 400 °C con un incremento de 10 °C/ min.

5.2.2.4 Potencial ζ

Se prepararon soluciones al 1 % p/v de quitosano nativo y quitosano-co-octil galato (QOG1 y QOG2) en solución de ácido acético al 1 % v/v manteniendo en agitación constante durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente las soluciones fueron diluidas a razón de 1:10 mL en una solución acuosa al 1 % de ácido acético y se inyectaron en la cámara de un instrumento de medición de tamaño de partícula y movilidad electroforética (ZEM3500, Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Worchesire., Inglaterra). El modelo matemático de Smoluchowsky fue utilizado para convertir las mediciones de movilidad electroforética en valores de potencial- ζ .

$$\zeta = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde: η es la viscosidad del medio, μ es la movilidad electroforética, ϵ es la constante dieléctrica y ζ es el potencial ζ .

Cada determinación se realizó por duplicado.

5.2.2.5 Determinación del contenido de los grupos amino por el método de ninhidrina

La cantidad de grupos amino libres del quitosano funcionalizado se determinó por el método propuesto por Alonso, y col., (2009). Se disolvieron 0.1 mg/mL de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 en una solución de ácido acético al 1 % v/v en agitación constante durante 24 h a temperatura ambiente. Se adicionó 1mL de solución de ninhidrina recién preparada y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 minutos. Transcurrido el tiempo la mezcla se colocó en un baño de agua hirviendo por 10 minutos y transferidas a un baño de agua con hielos, se les adicionó 5 mL de etanol al 50%v/v, se agitaron en un vórtex por 5 segundos y se filtraron utilizando papel filtro Whatman No. 40.

Posteriormente se les determinó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. La reducción en la absorbancia indicó la disminución del contenido de los grupos aminos libres.

5.2.2.6 Actividad antioxidante

Esta variable se determinó por dos métodos, el método DPPH que es el más aplicado, el cual utiliza el radical libre DPPH, que reduce el radical 1,1-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en la 1,1-difenil-1-picril hidracina, por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos $-OH$ que decoloran el reactivo DPPH. El DPPH es un radical libre relativamente estable; por lo tanto, EPR es un enfoque útil y práctico para la evaluación del potencial antioxidante del quitosano-co-octil galato, por ser una técnica espectroscópica sensible a electrones desapareados. Generalmente es el caso de radicales libres, para moléculas orgánicas.

5.2.2.6.1 Determinación espectrofotométrica

Se utilizó el método de DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidracilo) reportado por Sánchez-Moreno y col., (1998) con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones de quitosano y quitosano-co-octil galato a diferentes concentraciones (500, 800, 1000, 1200 y 1500 g / kg DPPH) y se hicieron reaccionar con 0.025 g / L con solución metanólica de DPPH• (2.9 g / ml). La mezcla se agitó y se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV-visible. El porcentaje de remoción del DPPH se calculó con la ecuación 8.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{Abso - Absm}{Abso} \times 100 \quad (\text{Ec. 8})$$

donde Abso es la absorbancia del blanco; Absm es la absorbancia de la muestra

5.2.2.6.2 EPR

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los materiales mediante EPR se utilizó un espectroscopio Bruker modelo E-500 Eleksys. Campo [G] 3436.15 a 3536.15, 1024 puntos; centro 3486.15; número de escaneos 4; amplitud [T] 0.0001; frecuencia [Hz] 100000; frecuencia de microondas [Hz] 9.778604e⁺⁹; potencia de microondas [w] 0.006395; tiempo de muestreo [s] 0.01024. Se prepararon soluciones ácidas de Q nativo y de ambos QOG a diferente concentración (500, 800, 1000, 1200, 1500 g/Kg de DPPH). Estas se mezclaron con solución metanólica de DPPH (0.025 g/L). Cada mezcla se dejó reaccionar durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se tomó un mililitro de cada mezcla, se colocó en una celda plana de cuarzo y se obtuvo el espectro de EPR. El porcentaje de la capacidad de remoción relativo se calculó siguiendo la metodología reportada por Pasanphan y col. (2010).

$$\% RC = \frac{h_0 - h_c}{h_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 9}).$$

Donde h_0 la altura del pico que pertenece al pico medio del espectro del antioxidante con DPPH; h_c la altura del pico que pertenece al pico medio del espectro del DPPH.

5.2.3 Caracterización reológica

5. 2.3.1 Viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca se obtuvo en un viscosímetro Oswald a 25 °C. Se prepararon soluciones stock de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 disolviendo 0.1 g de cada polímero en 25 ml de solución de ácido acético al 1 % v/v (Bastos y col., 2010). De la solución stock se prepararon cinco soluciones a diferente concentración y se midió el tiempo en que fluía. La viscosidad intrínseca se calculó mediante la ecuación de Huggins (Ec. 10)

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_1[\eta]^2 C \quad (\text{Ec. 10})$$

donde η_{sp} es la viscosidad específica, C la concentración de la solución, $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y k_1 es la constante de Huggins.

5.2.3.2 Viscosidad aparente

Se prepararon soluciones de quitosano nativo (Q_n) y de ambos quitosano-co-ctil galato (1%p/v), diluyendo 1 g de cada polímero en 100 ml de ácido acético o ácido láctico (1% v / v) bajo agitación mecánica durante 24 h. Estas soluciones se almacenaron a 5 °C para su posterior uso. Para conocer el efecto del plastificante, se añadió 1% v / v de glicerol a 30 ml a las soluciones y se mezcló durante 30 minutos bajo agitación continua. Se realizaron mediciones de flujo y oscilatorias a 25 °C en un reómetro Paar-Physica USD 200 Rheometer (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Germany) con una geometría cono plato con espacio anular de 0.05 mm.

5.2.3.3 Propiedades viscoelásticas

Se evaluaron las propiedades viscoelásticas aplicando un barrido de frecuencia en un intervalo de 0.01 a 10 Hz y se determinaron los módulos de almacenamiento o módulo elástico (G') y el módulo pérdida o módulo viscoso (G''). Las muestras se colocaron individualmente en la geometría de medición y se dejaron reposar durante 10 minutos antes de la prueba. Se utilizó un reómetro Paar Physica USD 200 a 25 °C utilizando una geometría cono plato con un espacio anular de 0.05 mm.

5.2.4 Caracterización de películas

5.2.4.1 Preparación de soluciones formadoras de película

Las soluciones formadoras de película se prepararon disolviendo quitosano nativo, QOG1 y QOG2 (1% p/v) en solución de ácido acético al 1 % (v/v) bajo agitación magnética durante 24 h a temperatura ambiente, se adicionó glicerol (1 %v/v) y se mantuvo la agitación durante 30 min. Se filtraron en tela de organza para eliminar las partículas que no se hayan disuelto y se eliminaron las burbujas por ultrasonido durante 5 minutos. 15 mL de cada solución se vertió en cajas Petri de polietileno de 10 cm de diámetro y se sometieron a evaporación a 35°C en una incubadora ShellLab Mod.61ZZMFG, sobre una superficie nivelada. Una vez secas se desprendieron de la caja y se almacenaron hasta su posterior análisis.

Se realizaron tres repeticiones por solución. También se prepararon soluciones formadoras de película sin glicerol.

5.2.4.2 Propiedades mecánicas

El porcentaje de elongación es el incremento de lo largo del material que ocurre antes de que se lleve el corte al someterse a una fuerza de tensión (Sperling, 2006; Pitak y col., 2011; Bonilla y col., 2013; Rubilar, y col., 2013; Sun y col., 2014).

Las películas obtenidas, se cortaron en tiras de 10 cm de largo por 10 mm de ancho y se acondicionaron en un desecador a 55 ± 2 % de humedad relativa por 48 horas con una solución saturada de NaBr. Se utilizó un Texture Analyzer Marca – Brookfield Engineering Laboratories, Modelo QTS-25/25 con una separación de mordazas de 5 mm y una carga de 0.01 N. Se midió en tiempo real la fuerza de fractura por tensión. A partir de los datos obtenidos se determinó el esfuerzo a la tensión y el porcentaje de elongación (%E) utilizando las ecuaciones 11 y 12:

$$ET = \frac{\text{Esfuerzo a la tensión}}{\text{Ancho x espesor de la película}} \quad (\text{Ec. 11})$$

$$\%E = \frac{\text{Deformación}}{\text{Longitud de la película}} \quad (\text{Ec. 12})$$

V.2.4.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

El espesor de las películas se midió con un micrómetro digital, Mitutoyo (Mitutoyo Ltd., Tokio, Japón) determinado en 10 puntos de cada muestra para obtener un valor promedio.

La PVA se determinó empleando una modificación del Método gravimétrico estándar de la ASTM, E 96-80 (ASTM, 1989), conocido como el método de la copa o celda de prueba, (Bosquez y col., 2003).

Muestras circulares de las películas previamente acondicionadas a 55 % humedad relativa se colocaron en la parte superior de viales fijándolas mediante un engargolado de aros de aluminio. En el interior de los viales se colocó solución sobre sobresaturada de bromuro de sodio para generar una humedad relativa de 92.5 %, de acuerdo a las condiciones de gradiente necesarias. Los viales se colocaron en una cámara previamente acondicionada a 75 % de humedad relativa con solución saturada de cloruro de sodio. Debido al gradiente de presión existente, el vapor de agua difunde a través de la película, observándose una pérdida de peso en la sal de mayor humedad relativa, durante el tiempo de la prueba. Cuando el peso de la sal de menor humedad relativa alcanza el equilibrio, ya no existe variación en el peso, y entonces éste se utiliza para calcular la velocidad de transmisión de

vapor de agua. Los cambios en el peso de los viales se registraron cada hora utilizando una balanza analítica Ohaus con precisión de 0.0001g.

El análisis de regresión de los datos registrados de la pérdida de peso en función del tiempo se empleó para calcular la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR_m), en los casos en que se obtuvieron coeficientes de regresión mayores o iguales a 0.997 (McHugh y col., 1993).

$$WVTR_m = \frac{n}{\Delta t \times A} \quad (\text{g m}^{-2} \text{ s}^{-1}) \quad (\text{Ec. 13})$$

donde n es el cambio de peso (g) de la celda de permeación durante el tiempo Δt con una área constante de 7.85 x 10⁻⁵ m².

La permeación es el segundo parámetro a determinar y se obtiene al dividir la WVTR_m entre el gradiente de presión parcial del vapor de agua.

$$Permeación = \frac{WVTR_m}{\Delta P} \quad (\text{g m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}) \quad (\text{Ec. 14})$$

donde ΔP es el gradiente de presión de vapor entre los lados de la película.

Con la tasa de transmisión de vapor de agua y considerando el espesor de la película, se obtiene la permeabilidad al vapor de agua con la siguiente ecuación:

$$Permeabilidad = Permeación \times \text{Espesor} \quad (\text{g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}) \quad (\text{Ec. 15})$$

5.2.5.4 Morfología por Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para caracterizar la microestructura de las películas se usó un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (HRSEM Jeol 7600F, Tokio, Japón). Las muestras de 5 mm se

colocaron en un porta muestra cilíndrico usando cinta adhesiva de carbono, empleando una aceleración de voltaje de 2.0 kV.

5.2.5.5 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto del agua en la superficie de la película se midió utilizando un goniómetro. Una muestra de película (20 mm x 80 mm) se colocó en la superficie nivelada horizontalmente con una micro pipeta se colocó sobre la superficie de la película 20µL de agua destilada. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (25 °C). El ángulo de contacto de la gota se calculó por análisis de imagen utilizando el software ImageTool (UTHSCSA, Version 3.00, Texas). Se obtuvieron cinco imágenes de las gotas por cada película (Leceta y col., 2013; Nunes y col., 2013).

5.2.5.6 Prueba antifúngica *in vitro* de de los quitosanos-co-octil galato en solución y de películas a base de quitosano nativo y quitosanos-co-octil galato contra *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*

La actividad antifúngica *in vitro* del quitosano nativo y QOG obtenidos se determinó en cajas con agar papa dextrosa (PDA). Se colocaron discos de agar (5 mm de diámetro) con cultivo puro de *Rhizopus s.* en el centro de cajas Petri con PDA que contenían solución de quitosano o quitosanos funcionalizados a diferentes concentraciones 0.05, 0.1, 0.25, 0.50 y 0.75 g/L las cuales se ajustaron un pH de 5.6 con hidróxido de sodio 1 N. El control contenía solamente PDA. Las cajas Petri se incubaron a 25 ± 2 °C, midiendo diariamente el diámetro de la colonia en dos direcciones hasta que el hongo cubrió completamente la caja control.

La misma metodología se empleó para la actividad antifúngica del *Colletotrichum g.*

También se determinó la actividad antifúngica *in vitro* de películas a base de quitosano nativo, QOG1 y QOG2. En cajas Petri con PDA se vertió un mL de solución formadora de película, se esparció en toda la caja y se dejó secar a temperatura ambiente durante 48 horas. Una vez formada la película se colocaron discos de agar (3 mm de diámetro) con

cultivo puro de *Rhizopus stolonifer* o *Colletotrichum gloeosporioides* en el centro de las cajas Petri. El control contenía solamente PDA.

5.2.5.7 Esporulación

La esporulación de *Rhizopus stolonifer* en los diferentes tratamientos se evaluó a las 48 h. Se tomaron tres cajas Petri a cada una le adicionó 10 ml de agua destilada estéril, con una varilla de vidrio se raspó la superficie de la caja para desprender las esporas, se filtró con gasa estéril, el filtrado se guardó en frascos. Para inhibir la germinación a cada suspensión de esporas se le agregó dos gotas de lactofenol, se agitó y se tomó 20 μl de las mismas y se colocaron en una cámara Neubauer para contabilizar las esporas en un microscopio óptico con un objetivo 40X (Nikon, Alphaphot-2YS2). Se contabilizó los campos A, B, C, D y E, la suma de estos se multiplicó por un factor (10,000) obteniéndose el número de esporas por tratamiento. Los datos se reportan en número de esporas mL^{-1} (Hernández-Albiter, y col., 2005; Sánchez-Dominguez, y col., 2007).

5.3 Aplicación de recubrimiento en frutos

Con el propósito de explorar el potencial como recubrimiento de las formulaciones preparadas con el quitosano funcionalizado, se aplicaron en dos especies de frutos: Mango y pera. El mango Ataulfo por ser un producto perecedero, posee una vida de anaquel corta lo que limita su transporte comercial, además es susceptible al daño por antracnosis. La pera seleccionada para el presente estudio fue la Anjou, es una de las variedades de mayor demanda en México y es susceptible a daños mecánicos y al ataque por fitopatógenos.

Los mangos Ataulfo utilizados el trabajo se compararon en la central de abasto de la ciudad de México, en estado de madurez verde, se seleccionaron por color, se lavaron con agua clorada (200 ppm), se dejaron secar, ya secas se recubrieron con las soluciones formadoras de películas a base de quitosano nativo y QOG2 ambas con y sin glicerol. Se mantuvieron a 25 ± 2 °C 58 % HR durante 6 días. Como control se dejaron mangos sin recubrir.

Las peras de Anjou se compraron en el mercado local, se lavaron con agua clorada (200 ppm). Se escurrieron. Se formaron unidades experimentales de 3 piezas con dos repeticiones. Se recubrieron con las soluciones formadoras de película a base de quitosano nativo, QOG2 con y sin glicerol y se mantuvieron a 25 ± 2 °C a 56 % HR durante 5 días. Como control se dejaron peras sin recubrir.

5.3.1 Pérdida fisiológica de peso

La pérdida fisiológica de peso se determinó pesando los frutos en una balanza analítica (OHAUS®) con precisión de 0.1 g cada 24 horas durante el tiempo del experimento. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo de cinética de pérdida de peso.

5.3.2 Determinación de color

Se determinó el cambio de color utilizando un colorímetro Hunter Lab Modelo ColorFlex® (Hunter Associates Laboratory, EUA) obteniendo datos de L^* , a^* y b^* de la escala CIELAB. Cromo y el ángulo hue se calcularon a partir de los valores L^* , a^* y b^* , de acuerdo con las siguientes formulas:

$$Croma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (Ec. 16)$$

$$Hue = \tan^{-1}\left(\frac{a^*}{b^*}\right) \quad (Ec. 17)$$

5.3.3 Firmeza de la fruta

Se determinó con un penetrómetro DIGITAL (tr®, Italy) como la fuerza máxima en Newtons (N) necesaria para penetrar la pulpa del fruto utilizando un émbolo de 5 mm de diámetro. Se

realizaron tres pruebas por fruto. Antes de la medición, se eliminó la piel para medir la firmeza de la pulpa.

5.3.4 Determinación de °Brix

Los °Brix se determinaron con un Refractómetro Atago. Se colocó una gota de jugo en el refractómetro y se midió el ° Brix. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento.

5.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de porcentaje de desacetilación, grado de inserción, potencial ζ , contenido de amino libres, permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas, ángulo de contacto, crecimiento micelial, esporulación, germinación, pérdida de humedad, firmeza, °Brix y color fueron procesados en un análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias por el método de Tukey. Se utilizó el programa OriginPro 8 v8.0724 (1991-2007).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 ATR-FTIR

La inserción del octil galato a la molécula del quitosano (Figura 8) puede inferirse por los espectros de ATR-FTIR (Figura 9). En el espectro del quitosano nativo se observa la señal característica del estiramiento asimétrico del grupo $-NH$ en la región de 3354 a 3286 cm^{-1} , en esta misma región se encuentra la vibración de estiramiento de los OH . En la misma manera para los otros grupos del quitosano, es decir, la banda a 2870.97 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento asimétrico y simétrico del CH_3 ; la banda que se presenta a 1651 cm^{-1} corresponde a la flexión de tijereteo del grupo amino ($-NH_2$) atribuida a las unidades acetiladas (grupos $-CONH_2$) y, la banda a 1585 cm^{-1} se asocia a la flexión del CH_3 (Abugoch, y col., 2011).

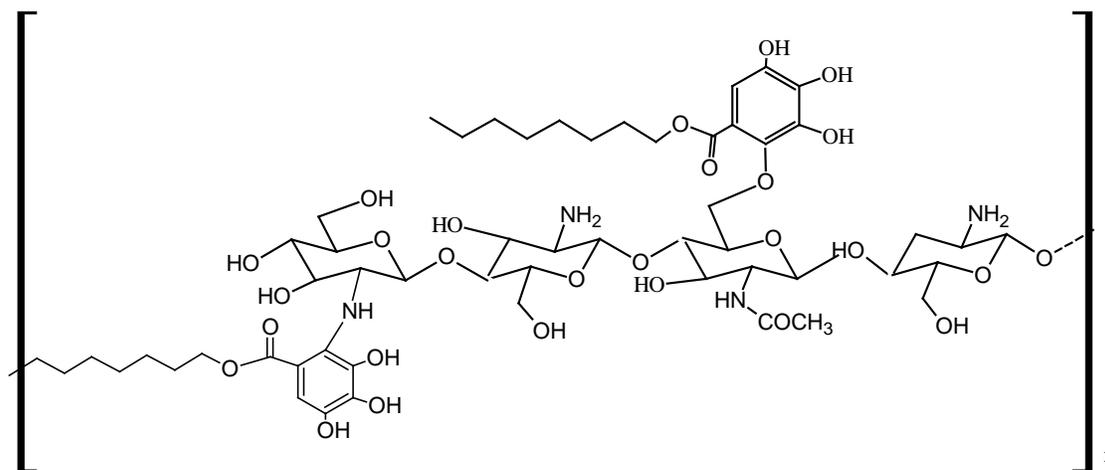


Figura 8. Molécula objetivo de quitosano-co-octil galato

Comparando con el espectro del quitosano, los espectros de los quitosano funcionalizados exhibieron un incremento en la región de absorción de $2850 - 2930\text{ cm}^{-1}$, que se atribuye al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos metileno. Se observó la señal del grupo carbonilo en la región 1716 cm^{-1} confirmando la inserción del octil galato. Esta señal es

similar al descrito por Vachoud y col. (2001) para el quitosano-co-dodecil galato y por Pasanphan y Chirachanchai (2008) para el quitosano-co-ácido gálico.

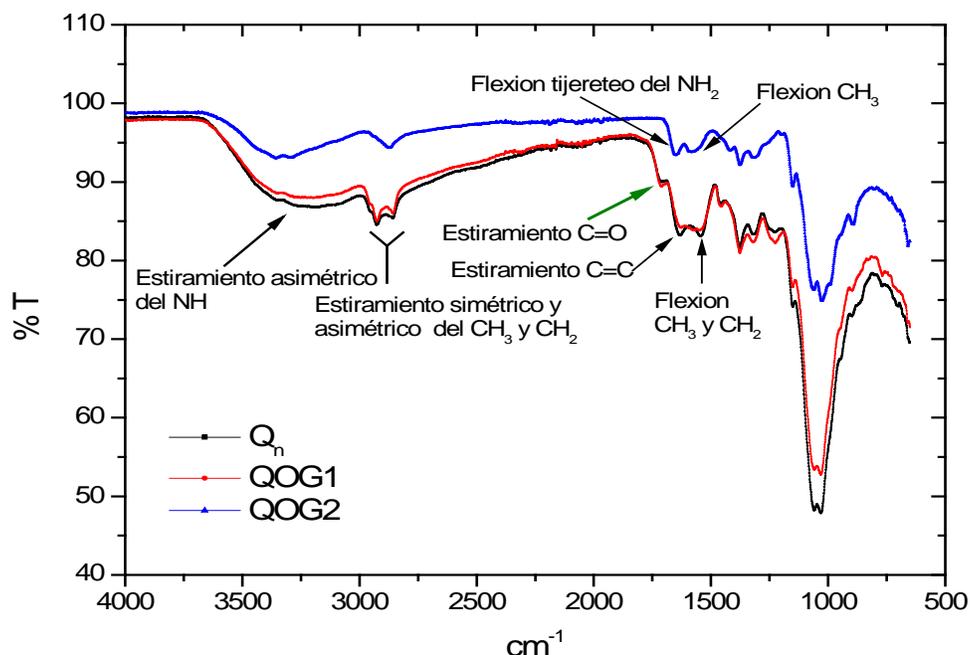
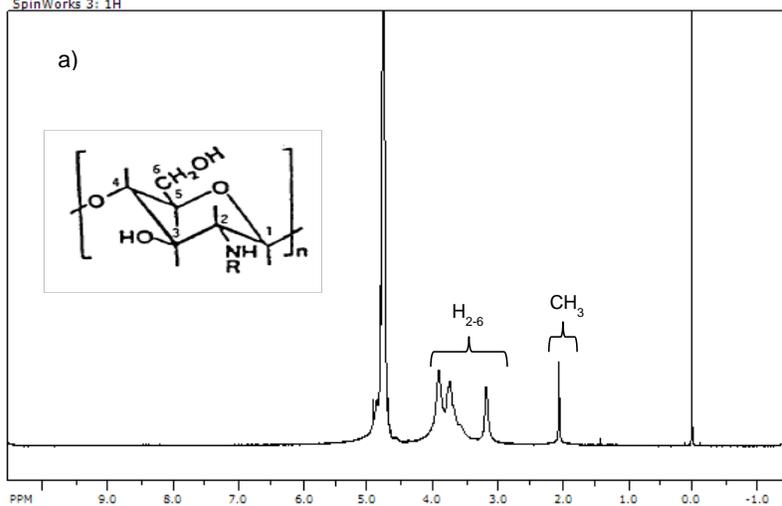


Figura 9. Espectro ATR-FTIR del quitosano nativo, QOG1 y QOG2

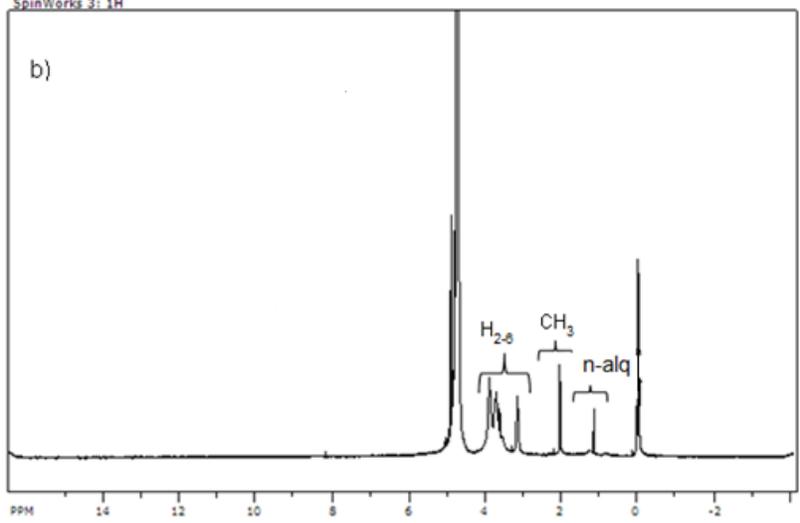
6.2 ^1H RMN, potencial ζ y aminos libres

En la Figura 10 se presentan los espectros de ^1H RMN del quitosano nativo, QOG1 y QOG2 con la correspondiente asignación de las señales en la estructura molecular. En los espectros del QOG1 (Figura 10b) y QOG2 (Figura 10c) se observa una señal a 1.0 – 1.2 ppm de los hidrógenos de la cadena alquílica, corroborándose la inserción del octil galato. A partir de la integración de las señales características de los espectros se obtuvo el porcentaje de DD y el porcentaje de inserción (% molar), los resultados se presentan en el Cuadro 1. El % DD del quitosano nativo utilizado en este trabajo (87.02 %) se encuentra en el intervalo de reportado de 85 – 99 % para quitosanos comerciales y es considerado adecuado para la inserción de compuestos fenólicos en los grupos amino (Bastos y col., 2010; Chen, y col., 2000; Pasanphan y col., 2010).

SpinWorks 3: 1H



SpinWorks 3: 1H



SpinWorks 3: 1H

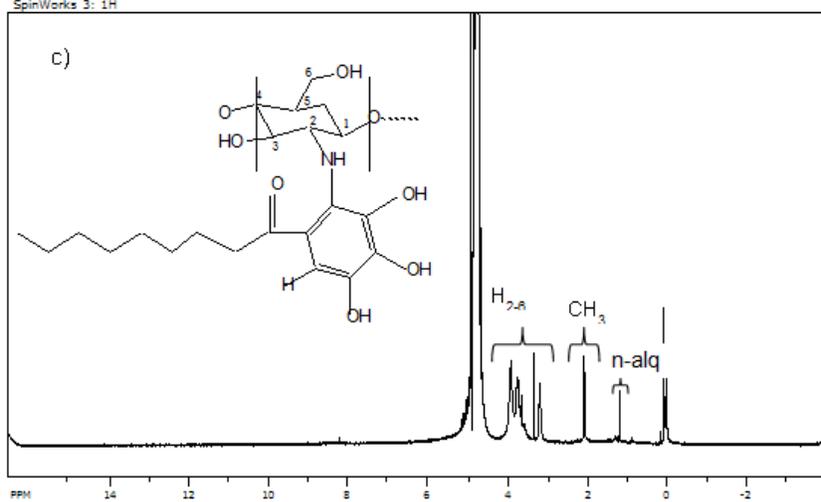


Figura 10. Espectro $^1\text{HRMN}$ del a) quitosano nativo, b) QOG1 y c) QOG2

En cuanto a las muestras injertadas, el % DD fue mayor para el QOG1 que para el QOG2. Esto concuerda con otros trabajos en los que reportan que al incrementar la concentración inicial de los compuestos fenólicos aumenta el grado de inserción a la molécula de quitosano. Sin embargo, los resultados de potencial ζ , los grupos aminos libres y el % molar indican lo contrario, son mayores para el QOG2, esto puede deberse a la presencia de oligómeros de polioctil galato unidos al quitosano o la propagación de octil galato no unidos al polisacárido, además de la inserción monomolecular de octil galato esperada, lo cual es más evidente a mayor concentración de octil galato. Otro aspecto en lo referente al potencial zeta y la determinación de amino libres es que no necesariamente la inserción se podría dar por los grupos amino como se indica en la Figura 8. Otra evidencia es la ausencia de la señal de los hidrógenos aromáticos, que señala el acoplamiento del carbono aromático con las unidades de octil galato. Esta hipótesis se corroboró al realizar una síntesis control sin la adición de quitosano y se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) obteniendo un rendimiento máximo de 23 % de oligómeros de peso molecular alrededor de 600 g/mol. Chen y col., (2000) presentaron evidencia de que debido a la formación de quinonas es posible que la inserción no se traduzca en una sola molécula injertada sino más bien pueden estar injertados al quitosano monómeros u oligómeros de fenoles La formación de quinonas estables a partir de octil galato es poco probable, la propagación de los compuestos fenólicos no se ha elucidado en este estudio así como en otros ya citados en los que se lleva a cabo inserción enzimática de ácido gálico o galatos en la molécula de quitosano.

Cuadro 1. Porcentaje de desacetilación, grado de inserción, potencial ζ y contenido de grupos amino libres del quitosano nativo, QOG1 y QOG2.

Muestra	% DD	% Molar	Potencial ζ (mV)	Contenido de grupos amino libres (Abs)
Q_n	87.02 ± 0.53 ^a	--	80.75 ± 2.19 ^a	0.61 ± 0.02 ^a
QOG1	83.62 ± 0.46 ^a	4.22 ± 0.04 ^a	67.70 ± 0.70 ^b	0.12 ± 0.07 ^b
QOG2	80.90 ± 0.98 ^a	11.75 ± 0.54 ^b	73.55 ± 0.21 ^c	0.37 ± 0.01 ^c

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente ($p < 0.005$). Q_n= quitosano nativo; QOG1 = quitosano octil galato; QOG2= quitosano octil galato.

6.3 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se empleó para evaluar la estabilidad térmica y determinar la temperatura de descomposición del quitosano nativo, QOG1 y QOG2. La Figura 11 muestra la pérdida de peso en función de la temperatura. En los termogramas del quitosano nativo, QOG1 y QOG2 se observaron dos etapas, en la primera, en un intervalo de 0 a 100 °C hubo una pérdida de peso alrededor del 5 %. En la segunda etapa, la pérdida de peso inició a 278°C, 250°C y 225°C correspondiente a la temperatura de descomposición del quitosano nativo, QOG1 y QOG2 respectivamente. Los resultados coinciden con los obtenidos por El-hefian, E. A.; (2010) quien reportó que la temperatura de descomposición del quitosano nativo inició alrededor de 250 a 280 °C. La diferencia en la temperatura de degradación de los QOG puede deberse a la inestabilidad térmica del octil galato (Itzincab- Mejia, y col., 2013). En conclusión estos resultados dan evidencia de la inserción del octil galato.

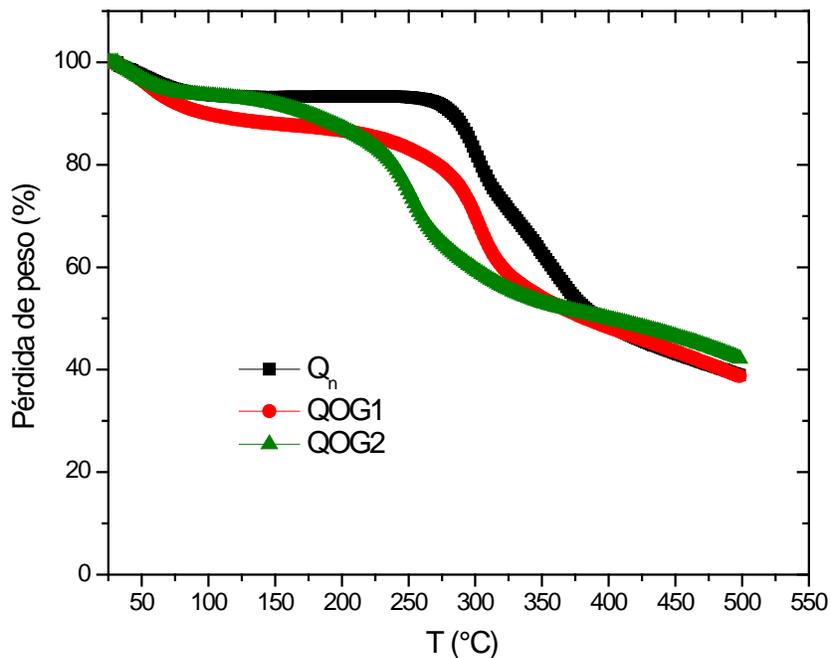


Figura 11. Termograma del quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2.

6.4 Capacidad antioxidante

6.4.1 Método espectrofotométrico

El porcentaje de inhibición en función de la concentración del antioxidante (quitosano nativo y quitosanos funcionalizados) se muestra en la Figura 12. Se observa que la capacidad antioxidante está relacionada directamente con la inserción de octil galato a la molécula de quitosano. El porcentaje de inhibición del quitosano nativo fue menor a los quitosano-co-octil galatos. A una concentración de 1,500 g/kg de DPPH el QOG2 inhibió hasta un 68.9%.

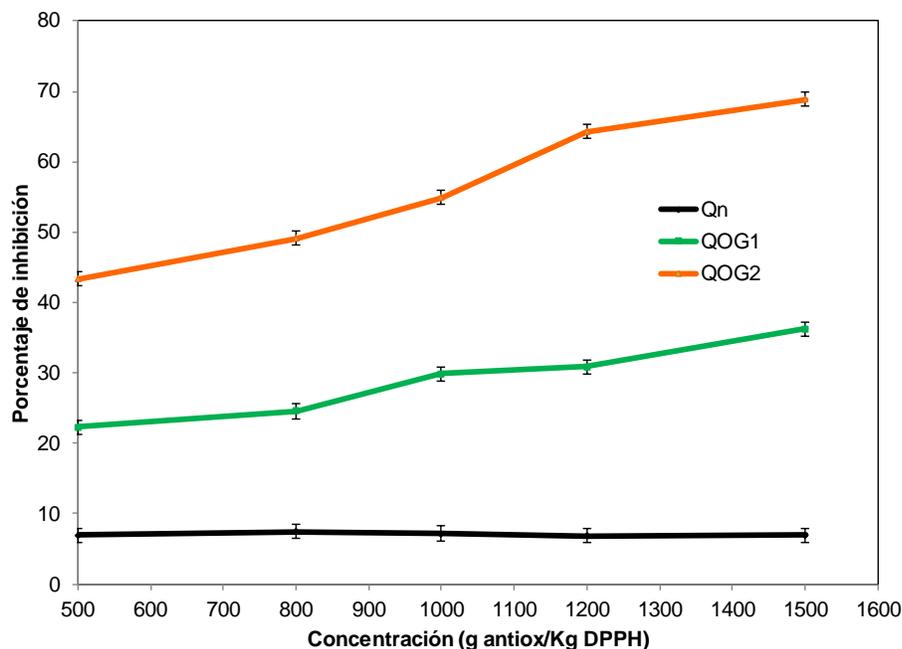


Figura 12. Porcentaje de inhibición del radical DPPH con el quitosano nativo (Q_n), quitosano-co-octil galato

Los resultados son comparables con aquellos reportados por Pasanphan y Chirachanchai (2008) quienes encontraron que la capacidad de remoción del quitosano-co-ácido gálico fue de 87% a una concentración de 1200 mM. En un estudio reciente realizado con el mismo derivado del quitosano, reportan una capacidad de remoción de 80% utilizando una concentración de 17.6 mg / ml (Cho, y col., 2011). Sin embargo, estos resultados fueron determinados utilizando el método espectrofotométrico de DPPH, el cual puede ser un método impreciso debido a que el radical DPPH en solución pierde color por la presencia de agentes reductores o por compuestos que transfieren átomos de hidrógeno (Prior y col., 2005).

6.4.2. EPR

La Figura 13 muestra la comparación de la capacidad de inhibición del radical DPPH del quitosano nativo, QOG1 y QOG2 a una concentración de 1500 g/kg de DPPH. La disminución de la señal de intensidad (G) indica la habilidad de remoción del radical DPPH de los quitosano. La capacidad de remoción del quitosano nativo fue menor (18.58%)

comparada con la de los QOG. Pasanphan y col., (2010) reportaron que el quitosano nativo no presentó capacidad antioxidante, sin embargo en este estudio se encontró que el quitosano nativo si presentó cierta capacidad antioxidante, esta diferencia puede deberse a la fuente de obtención, peso molecular, grado de inserción del polisacárido. La capacidad antioxidante del quitosano funcionalizado incrementó de acuerdo al porcentaje de inserción y las concentraciones estudiadas alcanzando hasta un 81% cuando se alcanzó la concentración de 1500 g/kg de DPPH. El valor de EC_{50} (concentración de antioxidante para reducir el radical en un 50 %) es un buen indicador del poder antioxidante. El valor máximo de EC_{50} para la remoción del DPPH obtenido por el método de EPR fue de 964 g/kg DPPH y 2180 g/kg DPPH para el QOG2 y QOG1, respectivamente.

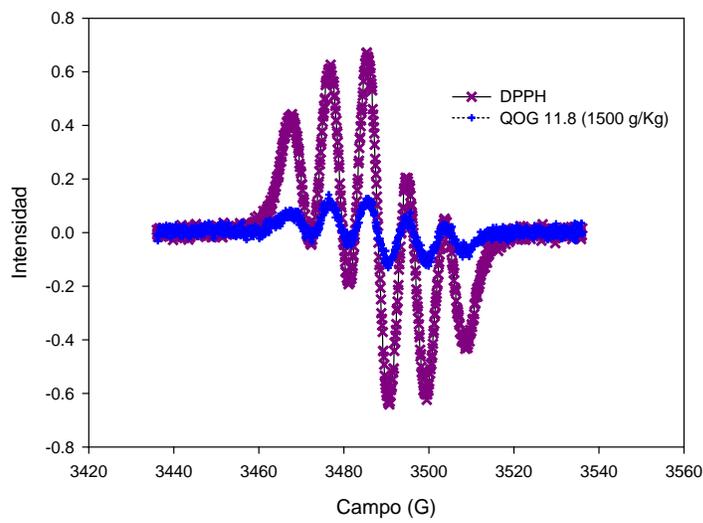
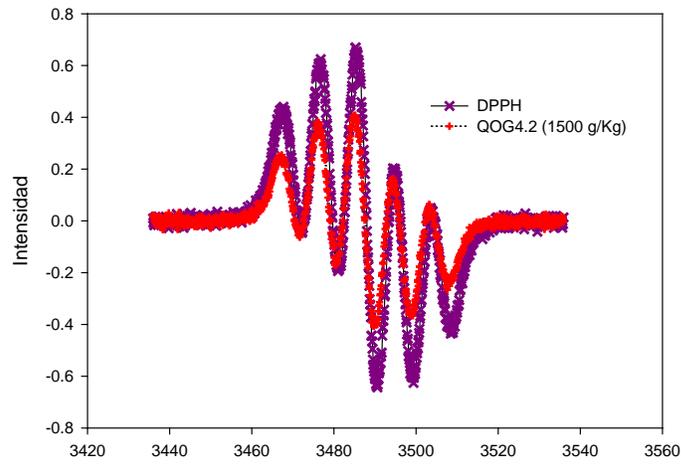
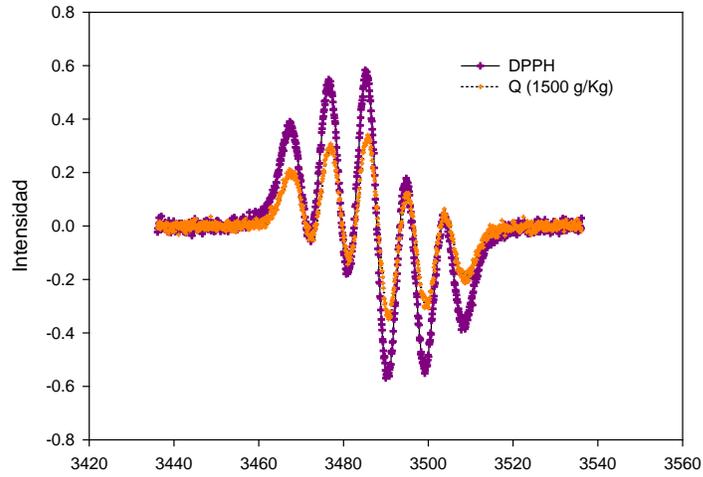


Figura 13. Espectros EPR de soluciones metanólicas (1500 g/Kg de DPPH) de quitosano nativo, QOG1 y QOG2.

Los resultados son comparables con aquellos reportados por Pasanphan and Chirachanchai (2008), quienes encontraron un 87% de capacidad de remoción del quisano-co-gálico cuando se usó una concentración máxima de 1200 μM . En un estudio más reciente con el mismo derivado reportan un 80% de capacidad de remoción a una concentración de 17.6 $\mu\text{g/mL}$ (Cho, y col., 2011). Sin embargo estos resultados fueron determinados por el método espectrofotométrico de DPPH y en el presente estudio se encontró que con EPR se encuentran valores más altos hasta un 15 % mayor. Esto porque la técnica de EPR detecta específicamente los radicales libres.

6. 5 Caracterización reológica

6.5.1 Viscosidad intrínseca

En el Cuadro 2 se presentan los valores de la viscosidad intrínseca y de la constante de Huggins. Se observa que el valor de la viscosidad de los QOG disminuye con respecto al quitosano nativo, lo que permite inferir que existe una mayor densidad de enrollamiento en la estructura de los quitosanos ramificados asumiendo conformaciones compactas. Los valores mayores en las constantes de Huggis son indicativos de una menor afinidad entre las moléculas del biopolímero y el solvente.

Cuadro 2. Viscosidad intrínseca y valores de la constante de Huggins del quitosano nativo, QOG1 y QOG2.

Muestra	$[\eta]$ (dL/g)	k_1
Q_n	16.91 \pm 0.04 ^a	0.21 \pm 0.04 ^a
QOG1	6.90 \pm 0.03 ^b	2.06 \pm 0.44 ^b
QOG2	5.27 \pm 0.06 ^b	2.03 \pm 0.29 ^b

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente ($p < 0.005$). Q_n= quitosano nativo; QOG1 = quitosano octil galato; QOG2= quitosano octil galato.

$[\eta]$ = viscosidad intrínseca; k_1 = Constante de Huggins

6.5.2 Curvas de flujo

La Figura 14 muestra la viscosidad aparente contra la velocidad de cizalla del quitosano nativo, QOG1 y QOG2 dispersos en ácido acético o ácido láctico. El quitosano nativo presentó un comportamiento Newtoniano independientemente el tipo del disolvente ácido. La dependencia de la viscosidad aparente respecto a la velocidad de cizalla para soluciones de quitosano a diferente concentración fue estudiada por Payet, y col., (2010) quienes reportaron una región Newtoniana a baja velocidad de cizalla y baja concentración debido al movimiento libre de las cadenas poliméricas a través del sistema sin perturbación de las cadenas vecinas. Los quitosanos funcionalizados mostraron un comportamiento de fluidización por cizalla. La viscosidad aparente y el comportamiento reoadelgazante se incrementaron con el grado de inserción cuando se empleó ácido acético como solvente. El comportamiento pseudoplástico de las soluciones de QOGs está relacionado con su estructura y la conformación de la cadena polimérica que forma enredos en solución. Cuando la velocidad de cizalla se incrementó, la rapidez de formación de desenredos moleculares fue mayor que la formación de nuevos enredos permitiendo una reducción de densidad de entrecruzamientos, y consecuentemente, la reducción de la viscosidad. Cuando se usó ácido láctico como disolvente, la viscosidad aparente de los QOGs fue menor que la del quitosano nativo en todo el intervalo de velocidad de cizalla como consecuencia de la presencia de grupos hidroxilos del ácido láctico que generan una estabilidad electrolítica que ofrece una menor resistencia a fluir debido a la interacción con los grupos amino e hidroxilo. Esta tendencia concuerda con lo reportado por varios autores (El-Hefian, y col., 2010; Hwang y Shin, 2000).

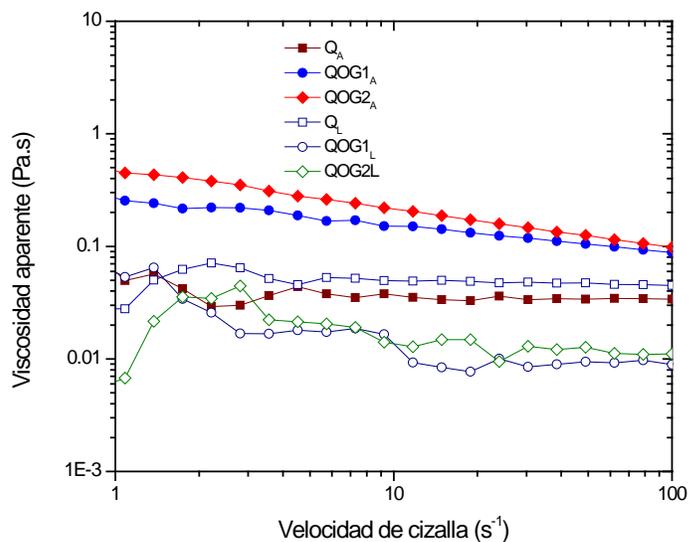


Figura 14. Curvas de flujo de soluciones de quitosano con diferente solvente. quitosano nativo (■); QOG1_A (●); QOG2_A (▲); Q_L (□); QOG1_L (○); QOG2_L (Δ). A, ácido acético; L, ácido láctico.

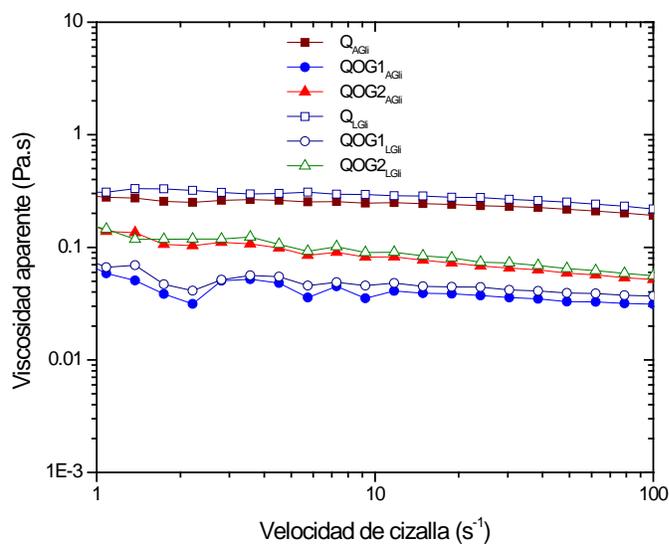


Figura 15. Curvas de flujo de soluciones de quitosano con diferente solvente y glicerol. Quitosano nativo (■); QOG1_A (●); QOG2_A (▲); Q_L (□); QOG1_L (○); QOG2_L (Δ). A, ácido acético; L, ácido láctico.

El modelo que mejor describe los datos experimentales ($R^2= 0.98$) es el de Oswald de Waele o Ley de la potencia (Ec. 19)

$$\eta = k\dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. 19})$$

donde η es la viscosidad aparente, k el índice de consistencia y n el comportamiento de flujo. El valor de k es una medida de la estructura y n indica la estabilidad mecánica. Los parámetros de la Ley de la potencia para los polímeros en solución se reportan en el Cuadro 3. Se observa que el índice del comportamiento del flujo (n) disminuyó con el grado de inserción, reflejando el comportamiento pseudoplástico de las soluciones de quitosano. Cuando se usó ácido acético como disolvente, el índice de consistencia (k) incrementó con el grado de inserción lo que sugiere que los enlaces intermoleculares y / o intramoleculares se intensifican debido a los grupos hidrófobos y conformación estructural del polímero; mientras que, cuando se usa ácido láctico, k para el QOG1 y QOG2 fue menor que para el valor del quitosano nativo, este hecho se puede atribuir a la inestabilidad del polielectrolito resultando un material más fluido en este disolvente.

Independientemente del tipo de solvente, el plastificante incrementó la viscosidad del quitosano nativo mostrando un comportamiento no-Newtoniano con carácter pseudoplástico (Figura 15). En el caso de los QOG, se observó una reducción de la viscosidad en el intervalo de velocidad de cizalla estudiado, esta reducción podría explicarse por la interacción entre los grupos hidroxilo de glicerol con los grupos amino e hidroxilo del quitosano disminuyendo el volumen hidrodinámico molecular.

El índice de consistencia (k), independientemente del tipo de disolvente, concuerda con los resultados obtenidos de potencial ζ , ya que la densidad de carga de la molécula del polímero ($Q_{\text{nativo}} > QOG2 > QOG1$) está asociada a la disponibilidad de los grupos amino, que a su vez interactúan con los grupos hidroxilo del plastificante, lo que resulta en enredos. A mayor densidad de carga mayor enredos y en consecuencia, un valor de k mayor.

Cuadro 3. Índice de consistencia (k) y comportamiento de flujo (n) de soluciones de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 con y sin glicerol (Gli).

Solución	n	k	R^2
Q_A	0.987	0.036	0.999
$QOG1_A$	0.756	0.271	0.999
$QOG2_A$	0.658	0.473	0.999
Q_{AGli}	0.875	0.348	0.999
$QOG1_{AGli}$	0.887	0.053	0.999
$QOG2_{AGli}$	0.797	0.132	0.999
Q_L	0.949	0.057	0.999
$QOG1_L$	0.913	0.013	0.976
$QOG2_L$	0.852	0.021	0.987
Q_{LGli}	0.861	0.423	0.999
$QOG1_{LGli}$	0.889	0.061	0.999
$QOG2_{LGli}$	0.789	0.147	0.999

Quitosano nativo_A (■); QOG1_A (●); QOG2_A (▲); Q_L (□); QOG1_L (○); QOG2_L (Δ). A, ácido acético; L, ácido láctico.

6.6.2 Propiedades viscoelásticas

Los cambios de G' y G'' en función de la frecuencia del quitosano, QOG1 y QOG2 dispersos en ácido acético o ácido láctico se presentan en la Figura 16. A frecuencias bajas (< 10 Hz) se observa un comportamiento como de líquido, donde el módulo de pérdida (G'') es mayor que el módulo de almacenamiento (G'). A 3 Hz, se observa un cruce entre los valores de los módulos viscoelásticos, a partir de esta frecuencia predominó la contribución elástica. La mayor dependencia de los módulos viscoelásticos con la frecuencia indica un comportamiento de gel débil. En lo que respecta a las soluciones de quitosano, QOG1 y QOG2 en ácido láctico, se observó una reducción de G' a mayor grado de inserción. Esto puede deberse a una mayor interacción entre el octil galato y los grupos hidroxilos del ácido láctico, reduciendo los entrecruzamientos moleculares. Cuando se empleó ácido acético, se observó lo contrario, es decir, se incrementan los enredos moleculares mostrando mayor G' .

Este comportamiento es típico de polisacárido como lo reportan varios autores (Bastos y col., 2010; El-Hefian y col., 2010; Hwang y Shin, 2000).

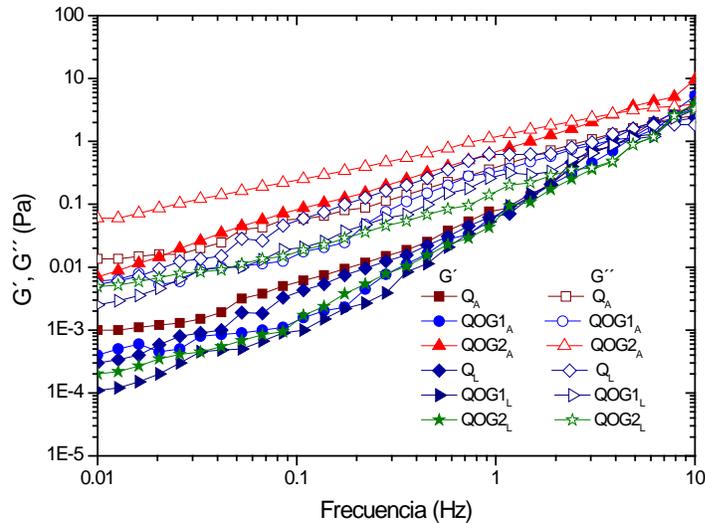


Figura 16. Efecto del tipo de ácido en el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') como una función de la frecuencia oscilatoria de soluciones de quitosano y quitosano octil galato a 25 °C. Símbolos llenos G' y símbolos vacíos G'' , Quitosano nativo_A (■); QOG1_A (●); QOG2_A (▲); Q_L (◆); QOG1_L (►); QOG2_L (*).A, ácido acético; L ácido láctico.

En la Figura 17 se muestra el efecto del glicerol en las propiedades viscoelásticas del tipo de ácido y glicerol. Dado que la movilidad de las cadenas poliméricas aumentó debido a la adición del plastificante, el valor de G' disminuyó mientras que el carácter viscoso incrementó (G''), evitando el cruce de los módulos en el intervalo de frecuencia estudiado.

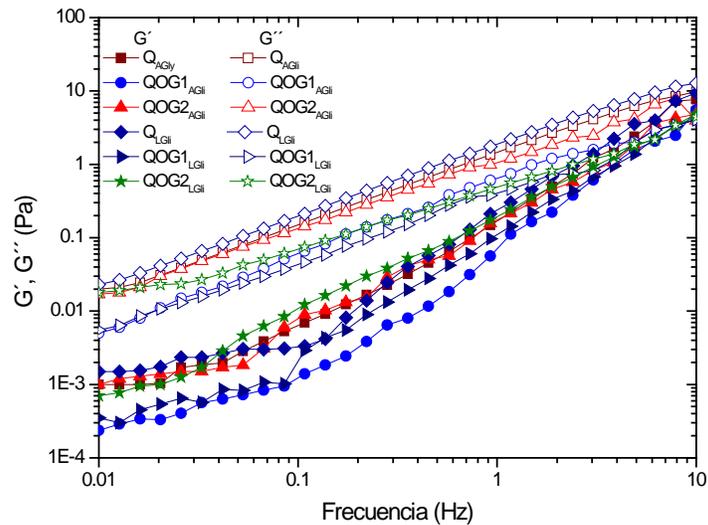


Figura 17. Efecto del tipo de ácido y glicerol en el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') como una función de la frecuencia oscilatoria de soluciones de quitosano y quitosano-co-octil galato a 25 °C. Símbolos llenos G' y símbolos vacíos G'' , Quitosano nativo_A (■); QOG1_A (●); QOG2_A (▲); Q_L (◆); QOG1_L (►); QOG2_L (*). A, ácido acético; L ácido láctico.

6.8 Caracterización de películas

6.8.1 Propiedades mecánicas

Formulaciones sin glicerol

El efecto de la inserción de octil galato a la molécula de quitosano y la adición de glicerol en el esfuerzo a la tensión (ET) y el porcentaje de elongación (%E) se presentan en el Cuadro 4. Las películas de quitosano nativo presentaron valores de ET de 2.80 kPa y %E de 0.96. El ET es menor (3.9 kPa) que el reportado por Rao y col. (2010) y el % E también fue menor comparado con los resultados de Rivero y col., (2013) y Leceta y col., (2013) quienes obtuvieron un % E de 6.10 y 4.59 respectivamente. Estas diferencias pueden atribuirse a factores tales como: la composición y fuente del quitosano, el medio ácido empleado como disolvente, tipo y contenido de plastificante, preparación de la película y condiciones

experimentales (Rivero y col., 2009, Sánchez-González y col., 2010, Rubilar y col., 2013, Silva-Weiss y col., 2013).

En el caso de los quitosanos funcionalizados, el efecto del octil galato en el ET y %E fue inverso a la concentración empleada en la funcionalización; siendo mayor en las películas QOG1 que para las de QOG2; este comportamiento podría explicarse por la formación de mayores enredos moleculares ocasionados por la mayor interacción entre las cadenas poliméricas del quitosano y el octil galato (véase 6.6.2) durante el secado de la película QOG1 dando como resultado una matriz más compacta y resistente. En el caso de la mayor inserción de octil galato, la posibilidad de la presencia de oligómeros de octil galato unidos a la estructura del quitosano y/u oligómeros de octil galato, impedirían la formación de una matriz más abierta lo que se traduciría en una menor resistencia de las películas.

Formulaciones con glicerol

La incorporación del plastificante tuvo un efecto adicional y significativo en el ET y %E esto es, las películas con mayor grado de inserción de octil galato (QOG2Gli) exhibieron un esfuerzo a la tensión y porcentaje de elongación mayor que las elaboradas con QOG1 y el quitosano nativo. Este comportamiento se puede explicar por un aumento en la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del glicerol y los grupos amino e hidroxilos del quitosano con los hidroxilos del octil galato, favoreciendo las interacciones inter e intramoleculares entre los dos componentes y como consecuencia la formación de una matriz estructural con mayor resistencia (valores de ET más altos).

Cuadro 4. Propiedades mecánicas, de películas a base de quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol (Gli).

Muestra	ET (kPa)	%E
Q_n	2.8 ± 0.9^{ab}	0.96 ± 0.03^a
QOG1	4.8 ± 1.6^{ab}	1.10 ± 0.32^a
QOG2	2.3 ± 1.1^a	0.48 ± 0.04^a
Q_n Gli	7.6 ± 0.1^b	8.56 ± 0.77^b
QOG1Gli	7.1 ± 2.6^{abc}	5.38 ± 0.34^c
QOG2Gli	10.3 ± 0.1^c	4.11 ± 0.09^{cd}

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente ($P < 0.005$)

6.8.2 Espesor y permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Efecto del glicerol y funcionalización en el espesor de las películas obtenidas.

Comparando el espesor entre las películas obtenidas con el nativo y los funcionalizados se encontró que las modificación *per se* genera películas más delgadas (Cuadro 5), lo que indica que la inserción del octil galato promueve una mayor interacción con el esqueleto del quitosano dando lugar a un mejor alineamiento de las cadenas poliméricas y mejor compactación.

Al adicionar el plastificante en la formulación se observó un incremento en el espesor, sin embargo se mantiene el efecto de la funcionalización. El aumento del espesor es ocasionado por un aumento en el volumen libre del polímero dado por la formación de puentes de H favorecidos por el glicerol.

Respecto a la PVA, las películas formuladas con el quitosano fueron más permeables que las elaboradas con QOG1 y QOG2 (Cuadro 5), esto era de esperarse ya que la molécula de octil galato tiene propiedades hidrofóbicas dada la cadena alquílica que posee; sin embargo el efecto no fue tan significativo como se hubiera deseado. Al incrementar el grado de

inserción de octil galato la PVA aumentó, esto se debe a la presencia de mayor grupos carboxilos y grupos hidroxilos del octil galato que son grupos hidrofílicos, los que pueden promover la transferencia de agua a través de la matriz polimérica.

Con la adición de glicerol la PVA de las películas formuladas con quitosano nativo y quitosano funcionalizado incrementó, esto se atribuye a que el glicerol incrementó el volumen libre y la movilidad de la cadena polimérica, reduciendo la rigidez de las películas, lo cual permite una mayor difusión de vapor de agua a través de su estructura. Por otro lado, el glicerol tiene cierto grado de hidrofiliidad, lo que favorece la absorción y desorción de las moléculas de agua. Los resultados concuerdan con otros autores donde la adición de plastificante incrementó la PVA (Cerqueira y col., 2011; Bonilla y col., 2013).

Cuadro 5. PVA y ángulo de contacto de películas a base de quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol.

Muestra	Espesor (mm)	PVA ($\text{g mmh}^{-1}\text{m}^{-2}\text{kPa}^{-1}$) $\times 10^{-4}$	Ángulo de contacto
Q_n	20.0 ± 0.71^a	3.51 ± 0.33^a	80.18 ± 9.61^a
QOG1	15.0 ± 0.00^b	2.31 ± 0.06^b	77.60 ± 3.57^a
QOG2	16.0 ± 6.0^a	3.29 ± 0.32^c	78.40 ± 5.41^a
$Q_n\text{Gli}$	29.0 ± 2.1^c	5.92 ± 0.39^d	86.82 ± 4.47^a
QOG1Gli	26.0 ± 0.00^d	4.78 ± 0.39^e	81.15 ± 4.52^a
QOG2Gli	28.0 ± 5.0^c	6.35 ± 0.38^f	79.40 ± 5.00^a

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente ($P < 0.005$)

6.8.3 Ángulo de contacto

Esta propiedad se determinó con el objetivo de conocer la hidrofobicidad / hidrofiliidad de las películas. El estado final de una gota de agua sobre la superficie de la película se toma como indicativo de la humectabilidad de la superficie por el agua. El ángulo de contacto incrementa cuando la hidrofobicidad de la superficie aumenta (Yuan y col., 2011; Pereda y col., 2012, Leceta y col., 2013). De acuerdo con lo anterior, todas las películas obtenidas son

hidrofílicas (Cuadro 5). A pesar de que no existe diferencia significativa en el ángulo de contacto se observa que las películas de los materiales funcionalizados son más hidrofílicas, esto puede deberse a la presencia de los grupos hidroxilos y carboxilos del octil galato que le confieren mayor hidrofílicidad a la molécula.

La hidrofílicidad de las películas incrementó con la adición del glicerol, lo que se atribuye a la hidrofílicidad del glicerol.

6.8.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Topografía de la superficie y corte transversal

La superficie de las películas de Q_n fueron, continuas y ligeramente granulosas (Figura 18 a), la micrografía de corte transversal muestra uniformidad de la compactación, y se aprecia claramente que esta formulación generó las películas de menor grosor $7.5 \mu\text{m}$ (Figura 18 d).

Las películas de QOG1 exhibieron una superficie más lisa y uniforme (Figura b) que las de Q_n ; aunque en la micrografía de corte transversal se observó homogeneidad de compactación, se puede distinguir cierto grado de porosidad de las películas (Figura 18 e). Por lo que respecta a las películas de QOG2, éstas presentaron superficies rugosas con irregularidades (Figura 18 c), apreciándose en el corte transversal una estructura más abierta y más porosa que la de QOG1 (Figura 18 f). Esto puede deberse a la presencia de oligómeros de octil galato unidos al quitosano o libres que impiden la formación de una matriz polimérica más estructurada, continua y porosa.

En la figura 19, se muestra el cambio notable en el aspecto de las películas cuando se agregó el plastificante (glicerol) en la formulación. En general la superficie de las películas mejoró, mayor homogeneidad en la lisura siendo más notable en las películas de QOG2. Sin embargo en el corte transversal se perdió parcialmente la homogeneidad de la porosidad y mayor grosor. Concretamente la porosidad se presentó en el siguiente orden $Q_n < QOG1 < QOG2$, lo cual estuvo asociado con el grosor de las mismas.

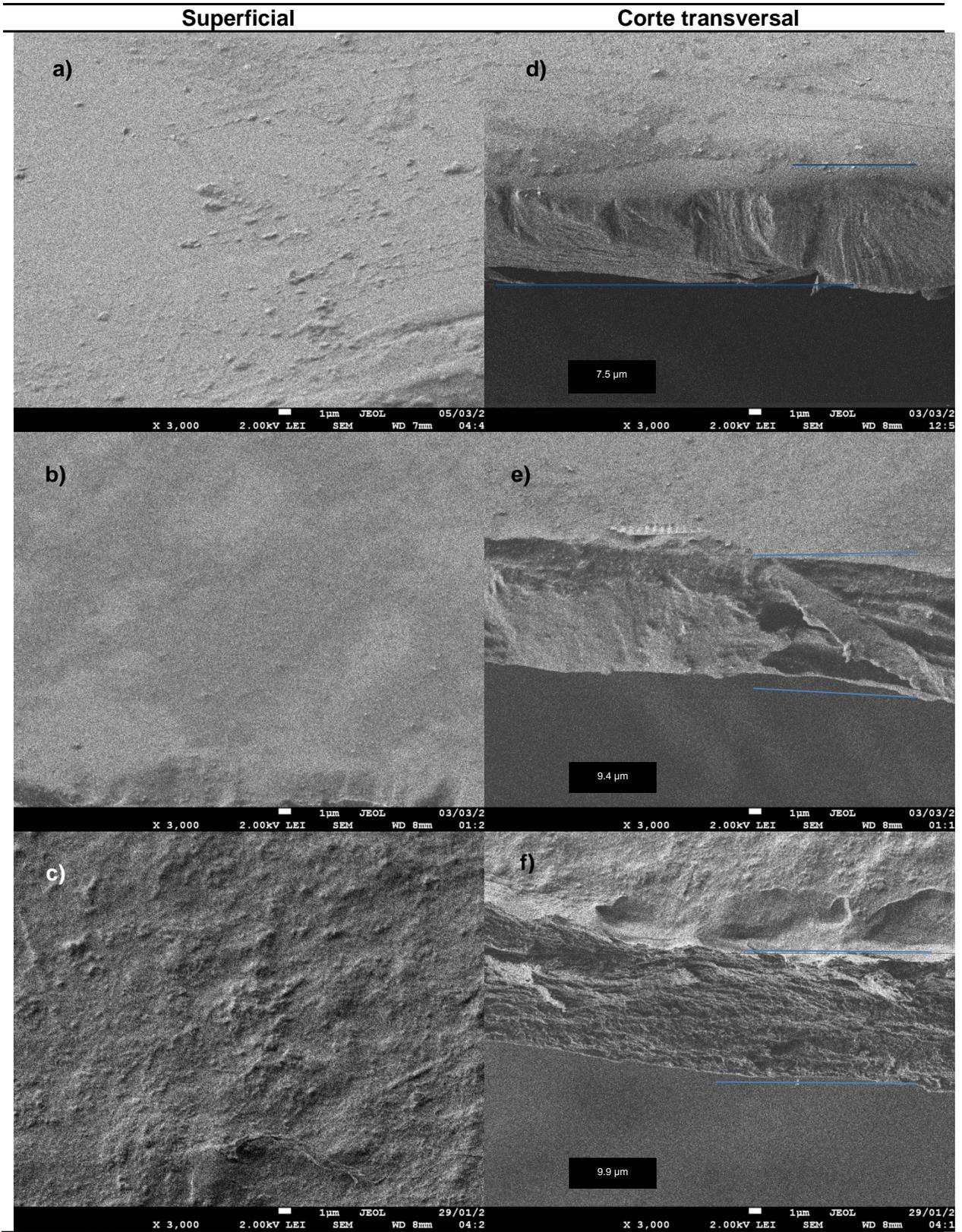


Figura 18. Micrografías de superficie de películas sin glicerol a) quitosano nativo, b) QOG1, c) QOG2, y corte transversal d) quitosano nativo, e) QOG1, y f) QOG2.

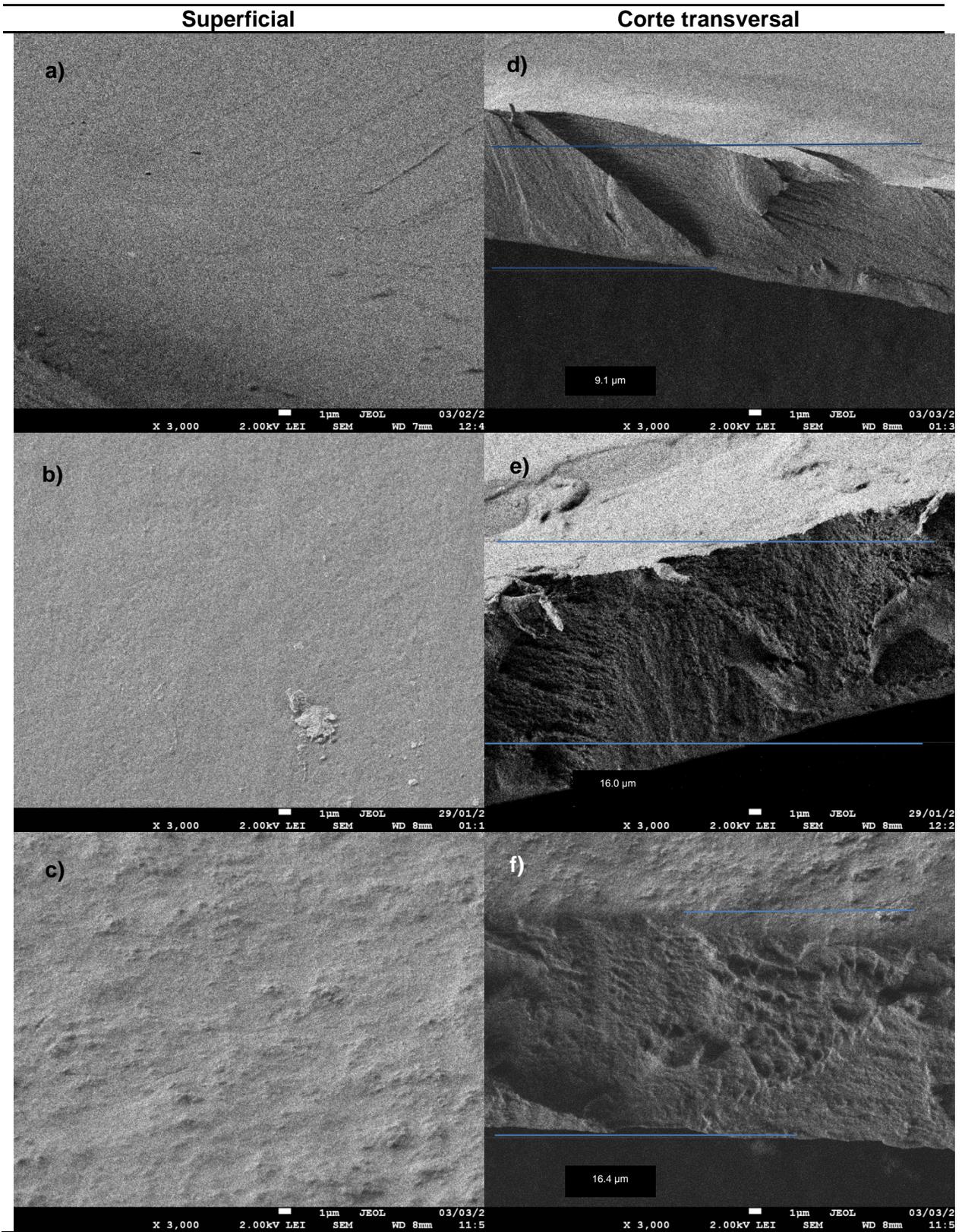


Figura 19. Micrografías de superficie de películas con glicerol a) quitosano nativo, b) QOG1, c) QOG2 y corte transversal d) quitosano nativo, e) QOG1, y f) QOG2.

6.9 Actividad antifúngica *in vitro* de quitosano nativo y quitosanos-co-octil galato en solución contra *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

En la Figura 20 se aprecia que la solución formadora de película a base de QOG2 fue la que tuvo el mayor efecto en reducir el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*, el cual fue de un 68% con respecto al control. El orden del efecto inhibitorio de mayor a menor fue QOG2>QOG1>Qn >Control. De acuerdo con lo reportado por Kubo y col., (2001) y confirmado por Fujita y Kubo (2002), Leal y col. (2009) y Hsu y col. (2009); la mayor eficacia en reducir la actividad antifúngica de las soluciones de QOG2 se explicaría por el hecho de que la “cabeza” y la “cola” del octil galato es similar a la de los alcoholes cuya acción antifúngica principal proviene de su habilidad para desorganizar la función asociada a membrana de las proteínas nativas integrales, al actuar como surfactante no iónicos (Kubo y col., 2001).

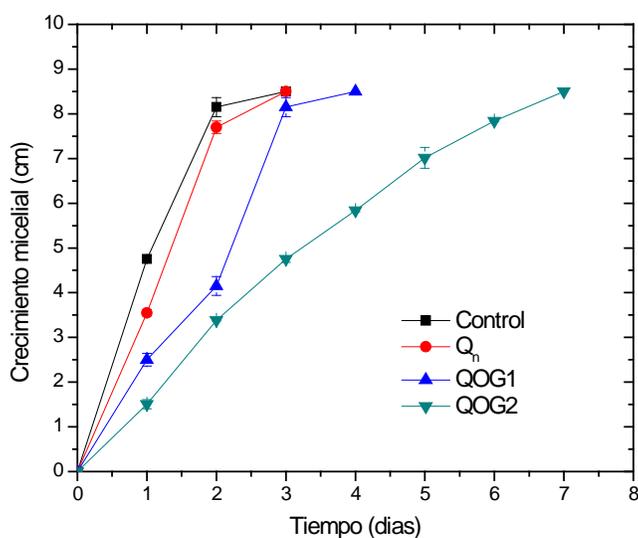


Figura 20. Crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* en medio PDA adicionado con soluciones de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 (0.75 g/L).

En el caso del *Colletotrichum gloeosporioides* el efecto de control del crecimiento micelial de los quitosanos funcionizados fue menor comparado con el efecto de los quitosanos contra el crecimiento micelial del *Rhizopus stolonifer*. Esto puede deberse a la diferencia estructural de los hongos; en el caso de *Rhizopus stolonifer* el micelio consiste de hifas cenocíticas, el

micelio posee septos espaciados, mientras que en el *Colletotrichum gloeosporioides* se ha reportado que tienen hifas septadas de pared más gruesa y conidios alargados, además, su crecimiento *in vitro* es lento (Cano y col., 2004; Rodríguez-López y col., 2009).

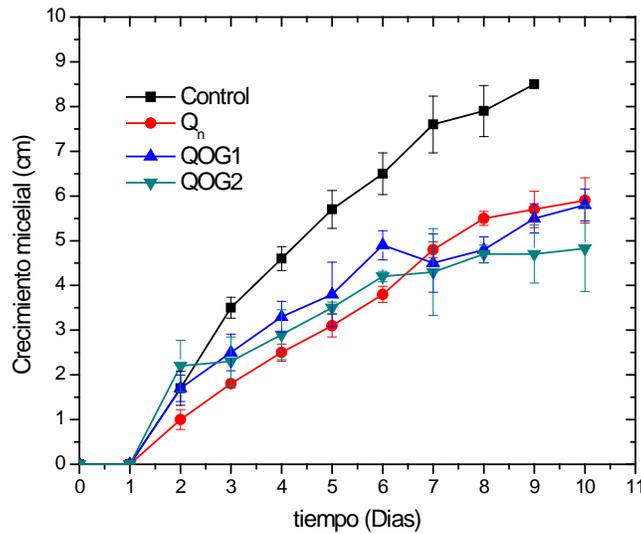


Figura 21. Efecto de soluciones de quitosano nativo, QOG1 y QOG2 a concentración de 0.75 g/L sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*

6.9.1 Efecto antifúngico de las películas formadas en estudios *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*

En lo que respecta a las películas, estas también exhibieron efecto antimicrobiano contra *Rhizopus stolonifer* siendo las películas de QOG2 y QOG2Gli inhibieron el crecimiento micelial en un 96 y 83 %, respectivamente comparadas con el control (Figura 22).

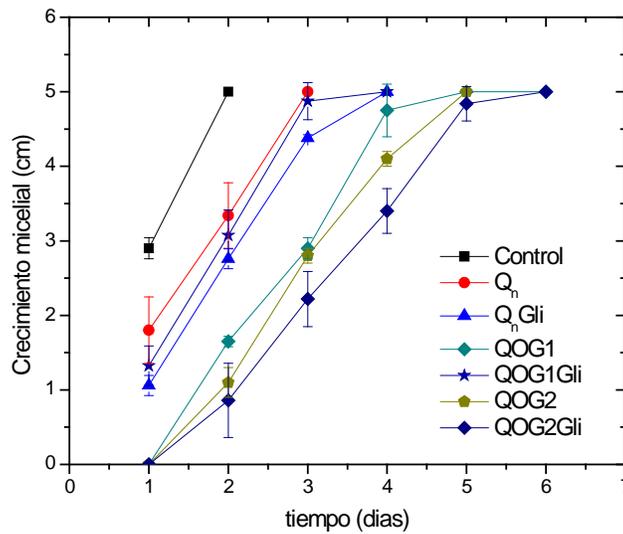


Figura 22. Efecto de películas elaboradas de quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2 con y sin plastificante sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

El efecto de las películas a base de quitosano nativo y quitosanos funcionalizados en el crecimiento micelial del *Colletotrichum gloeosporioides* se presenta en la Figura 23. Las películas de QOG1 y QOG2 sin y con glicerol exhibieron mayor control del crecimiento micelial, inhibieron el crecimiento en un 88 y 79.2 % respectivamente. Esto puede deberse a que las películas actuaron como barrera limitando la penetración de los tubos germinales del hongo a los nutrientes (Bautista-Baños, y col. 2003)

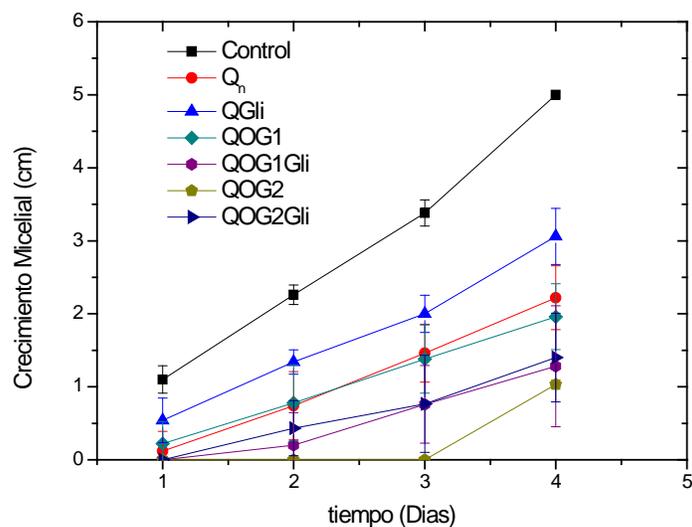


Figura 23. Efecto de películas elaboradas a base de quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol sobre el crecimiento in vitro del *Colletotrichum gloeosporioides*.

6.9.2 Esporulación

En el Cuadro 6 se presentan los resultados del efecto de las películas en la esporulación del *Rhizopus stolonifer* y del *Colletotrichum gloeosporioides*. Las películas sin glicerol redujeron la esporulación del *Rhizopus stolonifer* comparado con el control, estos resultados concuerdan con los reportados por Bautista-Baños y col. (2004), quienes reportan una reducción de esporas de hongos tratados con quitosano. Las películas con glicerol incrementaron la esporulación, esto puede deberse a una respuesta al estrés inducido por el polímero (Bhaskara Reddy y col., 1998; Bautista-Baños y col., 2004). Las películas de QOG2 y QOG2Gli disminuyeron la esporulación del *Colletotrichum gloeosporioides*.

Cuadro 6. Esporulaci3n de *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides* en PDA y cubiertas a base de quitosano nativo, QOG1 y QOG2.

Tratamiento	<i>Rhizopus stolonifer</i> (10 ⁶ ml ⁻¹)	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (10 ⁷ ml ⁻¹)
Control	8.70 ± 0.78 ^a	1.15 ± 0.16 ^a
Q _n	5.31 ± 0.49 ^b	1.84 ± 0.48 ^{ab}
QOG1	7.04 ± 0.78 ^{ab}	1.88 ± 0.03 ^b
QOG2	1.10 ± 0.062 ^c	1.57 ± 0.09 ^{ab}
Q _n Gli	8.00 ± 1.21 ^a	2.67 ± 0.07 ^c
QOG1Gli	9.48 ± 0.37 ^a	1.37 ± 0.11 ^{ab}
QOG2Gli	3.34 ± 0.82 ^{bc}	1.30 ± 0.34 ^{ab}

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente (P<0.005)

Con estos resultados se puede concluir que las pel3culas a base de QOG2 y QOG2Gli tienen mayor potencial de aplicaci3n para ser utilizadas en el control de estos dos fitopatógenos.

6.10 Aplicaci3n de recubrimiento a frutos

Para estudiar el efecto de los recubrimientos sobre frutos se eligieron mango Ataulfo y pera D'Anjou. El mango por tener un periodo de vida corto limita su transporte comercial a largas y distancias, adem3s es atacado por *Colletotrichum gloeosporioides* y la pera D'Anjou por ser una de las frutas de mayor demanda en M3xico y por ser susceptible a da1os mec3nicos.

6.10.1 P3rdida fisiol3gica de peso

En la Figura 24 se muestran la p3rdida de peso de los mangos recubiertos con las diferentes formulaciones. Los datos experimentales se ajustaron a una cin3tica de primer orden definido por la Ec. 20.

$$\frac{dM}{dt} = -kM$$

Ec. 20

Donde M es la pérdida de peso adimensional durante el tiempo (t), y k es la rapidez específica de pérdida de peso (h^{-1}).

Los valores del ajuste se reportan en el Cuadro 7. Como se aprecia, los valores de k son menores respecto al tratamiento control, la aplicación de los recubrimientos sobre los mangos mejoraron el intercambio de agua, la transferencia de gases y la transpiración durante el tiempo de almacenamiento.

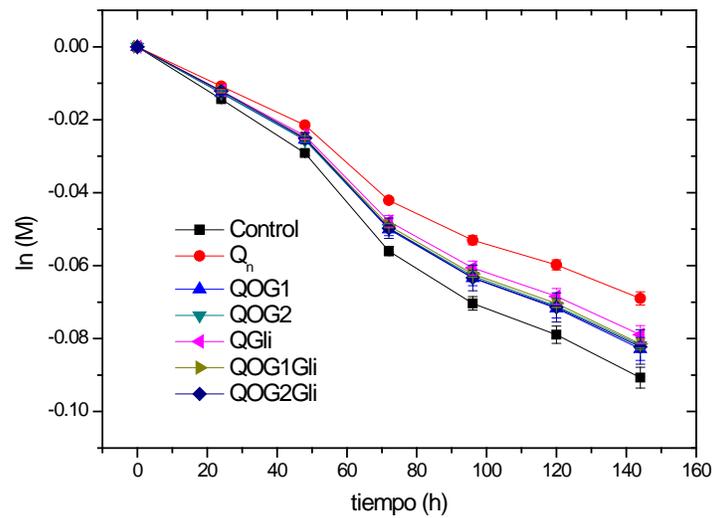


Figura 24. Pérdida de peso de mango Ataulfo recubiertos con quitosano nativo (Q_n), QOG1 y QOG2 con y sin glicerol.

Cuadro 7. Velocidad de pérdida de peso de los mangos recubiertos con las diferentes soluciones formadoras de película.

Tratamiento	k x 10⁻⁴ (h⁻¹)
Control	6.70 ± 0.19 ^{a,d}
Q_n	5.08 ± 0.14 ^b
QOG1	5.95 ± 0.20 ^{c,e}
QOG2	6.00 ± 0.27 ^{c,e}
Q_nGli	5.69 ± 0.09 ^c
QOG1Gli	5.95 ± 0.09 ^{c,e}
QOG2Gli	6.23 ± 0.03 ^{d,e}

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente (P<0.005)

EFECTO DEL RECUBRIMIENTO QOG2 EN PERA D'ANJOU

Se decidió estudiar el efecto de las formulaciones a base de QOG2 con y sin glicerol en el control de la pérdida de peso de peras D'Anjou.

El comportamiento de la pérdida de peso de las peras recubiertas se ilustra en la Figura 25. La pérdida de peso se ajustó a una cinética de primer orden (Ec. 20). Las formulaciones de QOG2 sin y con glicerol exhibieron menor control en la pérdida de peso, este comportamiento guarda relación con la porosidad de las películas, fueron permeables a gases, vapor de agua y a la transpiración.

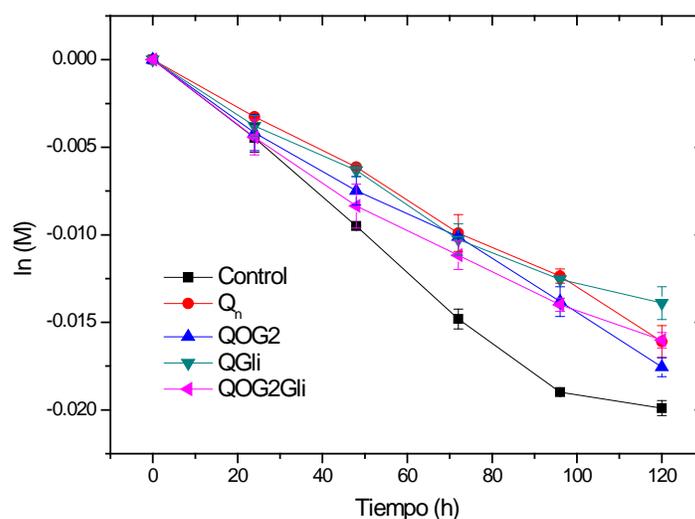


Figura 25. Pérdida de humedad de pera D´Anjou recubiertas con quitosano nativo y QOG2 con y sin glicerol.

Cuadro 8. Velocidad de pérdida de peso de peras recubiertas con las diferentes soluciones formadoras de película.

Tratamiento	$k \times 10^{-5} (h^{-1})$
Control	0.18 ± 0.04^a
Q _n	0.13 ± 0.07^b
QOG2	0.15 ± 0.07^b
Q _n Gli	0.13 ± 0.02^b
QOG2Gli	0.15 ± 0.08^b

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente ($P < 0.005$)

6.10.2 Determinación de color

Los datos correspondientes a los parámetros de color Hue (ángulo de matiz, °h) y Cromo (C) que representan el tono o matiz y la saturación, respectivamente, para los mangos recubiertos con las formulaciones sin glicerol y para las formulaciones con glicerol se presentan en la Figura 26. Se observa que los mangos sin recubrir cambiaron notablemente de color comparados con el color inicial de los mangos, esto era de esperarse, ya que

durante el almacenamiento los frutos maduraron alcanzando su color característico. Los mangos recubiertos con las formulaciones que contienen glicerol fueron más amarillos debido a un proceso de maduración más acelerado. Después de 6 días de almacenamiento Hue se encontró en el primer cuadrante, el color de los mangos recubiertos con las formulaciones sin y con glicerol fue amarillo pálido mientras que el control presentó color amarillo vivido (Figura 27).

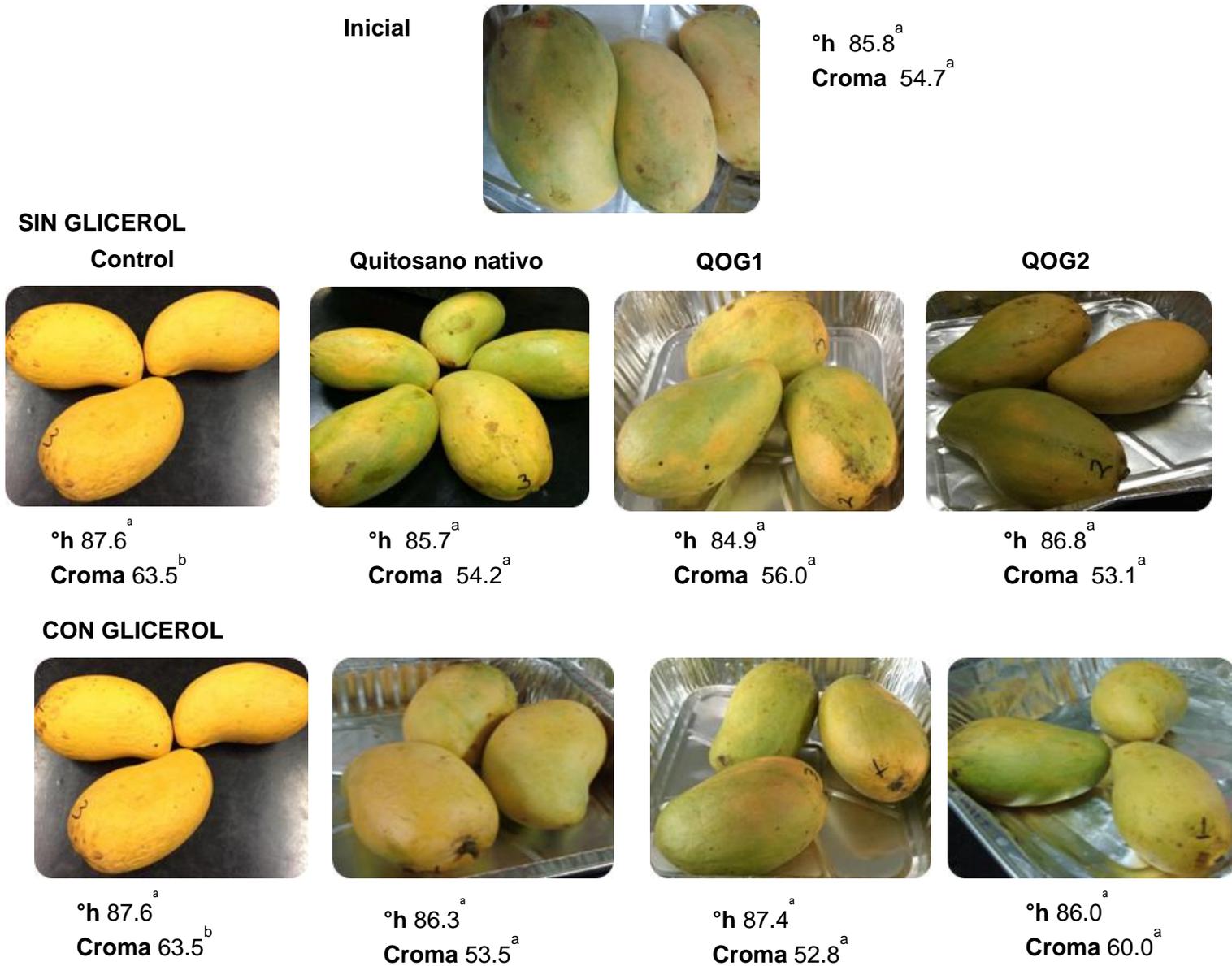


Figura 26. Parámetros de color de mangos recubiertos con las diferentes formulaciones después de 6 días de almacenamiento $25 \pm 2^{\circ}C$ y 58 % HR

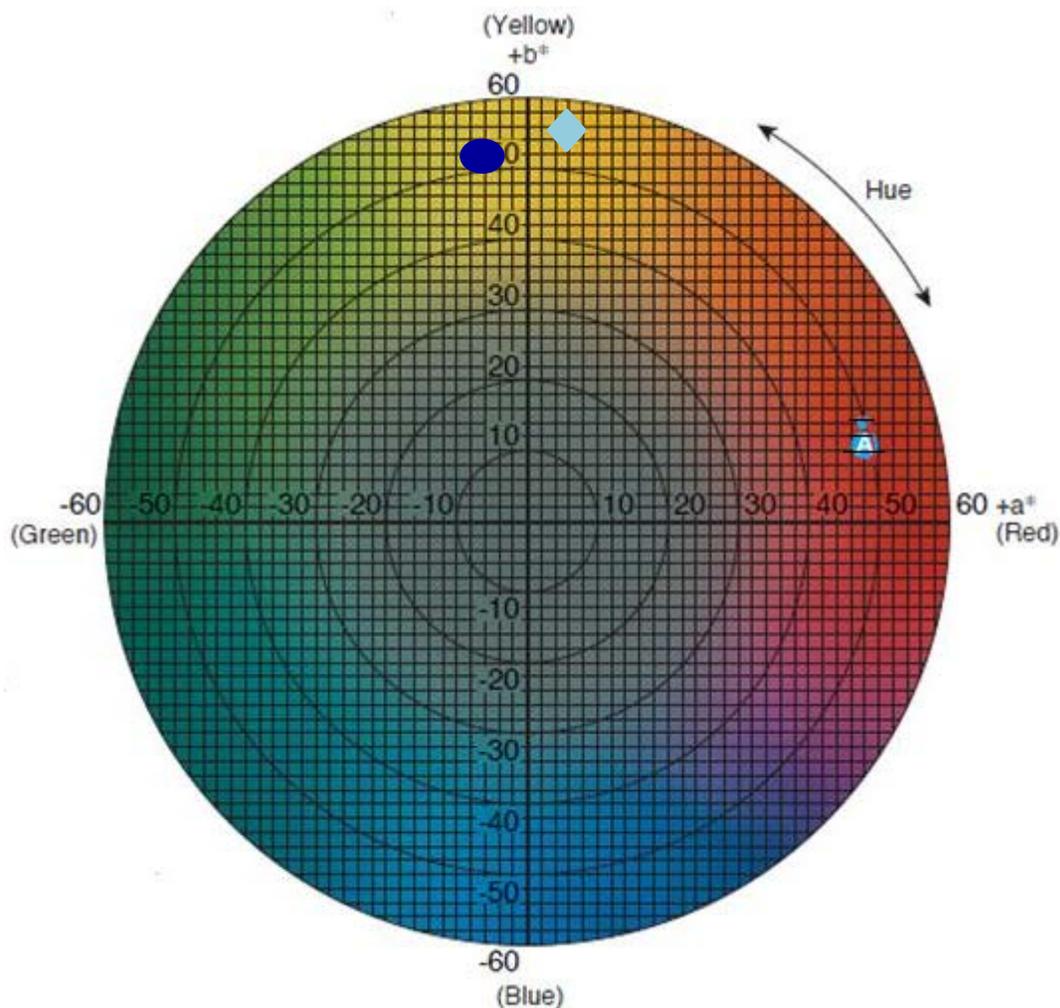


Figura 27. Circulo cromático $L^* a^* b^*$, ◆ color de mangos, ● color de peras

COLOR DE PERAS D' ANJOU

Los valores de Hue y Croma de las peras después del almacenamiento se presentan en la Figura 27. El valor de Hue de las peras a los 5 días de almacenamiento se encontró en el segundo cuadrante (Figura 28), lo cual concuerda con el cambio de color de las peras de verde a amarillo. Las peras recubiertas con QOG2Gli fueron las que exhibieron un cambio de color más notable esto se atribuye a que durante el almacenamiento las peras maduraron debido a que los recubrimientos no ofrecieron una barrera a gases y maduración.

Inicial



°h -83.25
Croma 50.07

SIN GLICEROL
Control



°h 86.5
Croma 53.9

Quitosano nativo



°h -86.87
Croma 49.7

QOG2



°h -83.9
Croma 50.3

CON GLICEROL



°h 86.5
Croma 53.9



°h -87.8
Croma 52.4



°h -83.9
Croma 50.7

Figura 28. Parámetros de color de las peras recubiertas con los quitosanos antes y después de los 5 días de almacenamiento a 25 °C y 56 %HR.

6.10.3 Firmeza y °Brix de mangos

En el Cuadro 9 se presentan los cambios registrados en la firmeza y °Brix al final del almacenamiento. Al comparar la firmeza de los mangos con el control, los tratamientos sin glicerol retuvieron mejor la firmeza y los °Brix incrementaron con respecto al control, esto puede deberse a que los recubrimientos no ofrecieron una barrera a la transpiración. Mientras que los frutos recubiertos con las formulaciones con glicerol permitieron un mayor intercambio gaseoso ocasionando una maduración gradual durante el almacenamiento, menor firmeza y mayor °Brix. Resultados similares fueron obtenidos por Valera y col., (2011) para mango “bocado” utilizando quitosano al 2 % y por Carrillo y col., (2000) quienes observaron que los °Brix de mangos Haden recubiertos incrementaron con el tiempo de almacenamiento.

Cuadro 9. Firmeza y °Brix de mango Ataulfo cubiertos con las diferentes soluciones con y sin Gli después de 6 días de almacenamiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ a 58 % HR.

Tratamiento	Firmeza (N)	°Brix
Inicial	18.7 ± 0.4^a	15.7 ± 0.6^a
Control	5.8 ± 0.2^b	18.9 ± 1.5^a
Q _n	7.6 ± 1.5^b	$16.7 \pm 1.5^{a,b}$
QOG1	6.5 ± 0.4^b	$16.1 \pm 1.8^{a,b}$
QOG2	7.7 ± 1.2^b	$16.6 \pm 1.5^{a,b}$
Q _n Gli	6.5 ± 0.8^b	18.8 ± 1.7^a
QOG1Gli	6.7 ± 0.5^b	$17.1 \pm 1.6^{a,b}$
QOG2Gli	6.0 ± 0.4^b	20.6 ± 1.7^b

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente ($P < 0.005$)

6.10.4 Firmeza y °Brix de peras

El patrón de firmeza y °Brix de las peras recubiertas (Cuadro 10) fue similar al obtenido para los mangos. Los recubrimientos ofrecieron mejor control del proceso de maduración en las peras.

Cuadro 10. Firmeza y °Brix de peras cubiertas con quitosano nativo (Q_n), QOG2 con y sin glicerol a los 5 días de almacenamiento a 25 °C y 56 %HR

Tratamiento	Firmeza (N)	°Brix
Inicial	26.7 ± 0.5 ^a	11.5 ± 0.14 ^a
Control	6.4 ± 0.36 ^b	13.1 ± 1.64 ^a
Q_n	8.7 ± 0.02 ^b	12.2 ± 0.09 ^a
QOG2	9.7 ± 1.38 ^b	11.9 ± 0.19 ^a
Q_nGli	8.0 ± 0.16 ^b	12.5 ± 0.45 ^a
QOG2Gli	7.6 ± 1.44 ^b	12.4 ± 0.07 ^a

Medias con diferente letra en la misma columna son diferentes significativamente (P<0.005)

VII. CONCLUSIONES

La funcionalización enzimática del quitosano permitió obtener inserción de octil galato de 4.22 y 11.75% confirmado por análisis de $^1\text{HRMN}$ y ATR-FTIR. Los polímeros obtenidos fueron estables térmicamente a 250 y 225 °C, respectivamente.

La capacidad antioxidante de los quitosanos funcionalizados depende del grado de inserción de octil galato. El EC_{50} (concentración de antioxidante para reducir el radical en un 50 %) fue de 964 g/kg DPPH y 2180 g/kg DPPH para el QOG2 y QOG1, respectivamente.

Los quitosanos funcionalizados controlaron el crecimiento micelial *in vitro* de ambos fitopatógenos.

El tipo de disolvente tuvo efecto en las propiedades reológicas, con el ácido acético se incrementó la viscosidad aparente y el comportamiento reoadelgazante en función del grado de inserción. La adición del glicerol tuvo efecto negativo en las propiedades reológicas, disminuyó la viscosidad aparente y el comportamiento reoadelgazante. Las soluciones de QOG2 con y sin glicerol en ácido acético tuvieron mayor estructura y estabilidad.

El módulo de pérdida G'' fue mayor que el módulo de almacenamiento G' , esto es el carácter viscoso prevaleció sobre el carácter elástico. El comportamiento viscoso (G'') se incrementó con la adición de glicerol independientemente del tipo de solvente utilizado.

Los quitosanos funcionalizados a las concentraciones aplicadas fueron eficaces en el control del crecimiento micelial del *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y ángulo de contacto fueron afectados por el grado de inserción y la adición del plastificante. Las películas de QOG2 y QOG2Gli fueron las que presentaron mejores propiedades mecánicas y PVA.

Las características morfológicas están estrechamente relacionadas con las propiedades mecánicas y de barrera.

Las películas a base de quitosanos funcionalizados sin o con glicerol fueron eficaces en el control de crecimiento micelial *in vitro* de los dos fitopatógenos estudiados.

Los recubrimientos sin y con glicerol ofrecieron una barrera al vapor de agua, gases, que permiten una maduración gradual.

Los frutos recubiertos se conservaron durante 5 y 6 días, con las características sensoriales aceptables sin desarrollo de pudriciones tanto en mangos como en peras bajo las condiciones de almacenamiento y tratamiento.

IX RECOMENDACIONES

De acuerdo a la experiencia en el desarrollo del presente trabajo se recomienda:

Realizar un diseño experimental variando el tipo y concentración de solvente y concentración de plastificante.

Para conferir hidrofobicidad a las películas adicionar un compuesto hidrofóbico compatible con el quitosano funcionalizado.

Evaluar el efecto de la temperatura de secado en las propiedades de barrera, mecánicas y estructurales de las películas.

X REFERENCIAS

- Abugoch, E. Lilian; Tapia, Cristián; Villamán C. Maria, Yazdani-Pedram, Mehrdad; and Díaz-Dosque, Mario. (2010). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25: 879 – 886.
- Aguilar M. M. A. (2005). Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada.
- Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J. D., and Shirai, K. (2009). Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 536–543.
- Alves, M. N., and Mano, F. J. (2008). Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 401-414.
- Assis, O.B.; and Pessoa, J.D. (2004) Preparation of thin films of chitosan for use as edible coatings to inhibit fungal growth on sliced fruits. *Scientific Note, Braz. Journal Food Technol.* 7: 17-22.
- Avena-Bustillos, R.J., Cisneros-Zevallos, L.A., Krochta, J.M. and Saltveit, M.E. Jr. (1993). Application of Casein-lipid Edible Film Emulsions to Reduce White Blush on Minimally Processed Carrots. *Postharvest Biology and Tech.* 4:319-329.
- Bangyekan C.; Aht-Ong D.; and Srikulkit K.; (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate polymers*. 63, 61-67.
- Bastioli, C. 2001. Global status of the production of biobased packaging materials. *Starch/Stärke*. 53:351-355
- Bastos, S. D., Barreto, N. B., Souza, S. H., Bastos, M., Rocha-Leão, M. M. H., Andrade, T. C., et al. (2010). Characterization of a Chitosan simple extracted from Brazilian shrimps and its application to obtain insoluble complexes with a commercial whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 24, 709-718.
- Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M.; Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22, 1087 -1092.
- Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M. y Bosquez-Molina, E. (2004). Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de fitopatología*, 22 (2), 178 – 186.

- Belalia R.; Grelier S.; Benaissa M. and Coma, V., (2008) New Biomateriales Based on Quaternized Chitosan. *Journal. Agric. Food Chem.*, 56, 1582 – 1588.
- Benitez, C. (2001). Cosecha y Poscosecha de peras y manzanas en los valles irrigados de la Patagonia". Publicado en línea en 2012 <http://inta.gov.ar/documentos/beurre-danjou/>
- Bhaskara Reddy, B. M. V.; Ait, Barka, E.; Castaigne, F.; Arul, J. (1998). Effect of chitosan on growth and toxin productions by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Science Technology*. 8, 33- 43.
- Biquet, B. and Labuza, T.P. (1988). Evaluation of the moisture permeability of chocolate films as edible moisture barrier. *Journal of Food Science*, 53: 989-991.
- Bonilla, J.; Atarés, L.; Vargas, M.; Chiralt, A. (2013). Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. *Journal of Food Engineering* 114, 303–312.
- Bosquez M. E. (2003). Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con Goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinética de deterioro en fresco del limón persa (*citrus latifolia tanaka*). Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- Brasil, I. M., Gomes, C., Puerta-Gomez, A., Castell-Perez, M. E., and Moreira, R. G. (2012). Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh cut papaya. *LWT Food Science and Technology*. 47: 39 - 45
- Broussignac, P. (1996). Chitosan: a natural polymer not well known by the industry. *Chemistry Industry Genie Chimica* 99 (9):1242-1247.
- Casariego, A.; Souza, B.W.S; Cerqueira, M.A.; Teixeira, J.A.; Cruz, L.; Díaz, R.; and Vicente A.A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*. 23: 1895–1902.
- Chao, An-Chong; Shyu, Shin-Shing; Lin, Yu-Chuang; and Mi, Fwu-Long. (2004). Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan—to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent. *Bioresource Technology*, 91, 157–162.
- Chen, T.; Kumar, G.; Harris, M. T.; Smith, P. J.; and Payne, G. F. (2000). Enzymatic Grafting of Hexyloxyphenol onto Chitosan to Alter Surface and Rheological Properties. *Biotechnology and bioengineering*, 70, (5) 564-573.
- Chen, Y.C.; Wang, C.H.; Lai, L.S. and Lin, K.W. (2003). Rheological Properties of Chitosan and its Interaction with Porcine Myofibrillar Proteins as Influenced by Chitosan's Degree of Deacetylation and Concentration. *Journal of Food Science*. 68 826-831.

- Cheng, M; Deng, J.; Yang, F.; Gong, Y.; Zhao, N.; and Zhang, X. (2003). Study of physical properties and never cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solution. *Biomaterial*. 24 2871- 2880.
- Chenite, A.; Buschmann, M.; Wang, D.; Chaput, C.; and Kandani, N. (2001). Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrated polymers*, 46, 39-47
- Chien, P. J., Sheu, F., and Yang, F. H. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78, 225–229.
- Chillo S.; Flores S.; Mastromatteo M.; Conte A.; Gerschenson L.; and Del Nobile M.A. (2008). Influence of glicerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88; 159-168.
- Cho, J.; Heuzey, Marie-Claude; Bégin, A., and Carreau, P.J. (2006). Viscoelastic properties of chitosan solutions: effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering*. 74, 500-515.
- Cho, Y. S., Kim, S. K., and Je, J. Y. (2011). Chitosan gallate as potential antioxidant biomaterial. *Bioorganic & Medical chemistry letters*. 21, 3070-3073.
- Chung, Y. C.; Su, Y. P.; Chen, C. C.; Jia, G.; Wang, H. L.; Wu, J. C. G.; y Lin, J. G. (2004). *Acta Pharmacology Sinica*, 25, 932–936.
- Cano, J.; Guarro, J.; and Gené, J. (2004). Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum* Species of Clinical Interest. *Journal of clinical microbiology*,
- Coma V., Martial-Gros A., Garreau S., Copinet,A., Salin F., and Deschamps A. (2002). Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal of Food Science—Vol. 67, Nr. 3*.1162-1169.
- Coma, V., Deschamps, A., and Martial-Gros, A. (2003). Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer: Antimicrobial activity assessment on diary related contaminants. *Journal of Food Science*, 68 (9), 2788–2792.
- Curcio, M.; Puoci, F.; Iemma, F.; Parisi, O. I.; Cirillo, G.; Spizzirri, U. G.; and Picci, N. (2009). Covalent Insertion of Antioxidant Molecules on Chitosan by a Free Radical Grafting Procedure. *Journal Agriculture Chemistry*, 57, 5933-5938.
- Casas M.; Valvi, D.; Luque, N.; Ballesteros-Gómez, A.; Carsin, AE.; Fernandez, MF.; (2013) Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children. *Environmental International*, 56, 10-8.

- Cuq, B.; Aymard, C.; Cuq, J. L., and Guilbert, S. (1995). Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science*, 60, 1369-1374.
- Debeaufort, F., and Voilley, A. (1995). Methyl cellulose-based edible films and coatings I. Effect of plasticizer content on water and 1-octen-3-ol sorption and transport. *Cellulose*, 2, 205-213
- Debeaufort, F. Quezada-Gallo, J.A. and Voilley, A. (1998). Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Critical Rev. Food Science*. 38(4):299-313.
- Du, J. M., Gemma, H., and Iwahori, S. (1997). Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66, 15–22.
- Dutta, P. K.; Ravikumar, M. N. V.; and Dutta, J. (2002). *Journal of macromolecular science*, 3 (42), 307 – 354.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., and Dutta, J. (2009). Perspective for chitosan based antimicrobial films in food application. *Review. Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- El Ghaouth A, Arul J.; Ponnampalam R, and Boulton M. (1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Sci*, 56, 1618-1620, 1631.
- El-Hefian, E. A.; Elgannoudi, E. S.; Mainal, A.; and Yahaya, A. H. (2010). Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal Chemistry*, 34, 47 – 56.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1996). Octyl gallate. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-300.pdf>
- Fernández Cervera, M. ; Karjalainen, M.; Airaksinen S.; Rantanen, J.; Krogars K.; Heinämäki J.; Iraizoz Colarte A.; and Yliruusi J.; (2004). Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58, 69-76.
- Fessenden, R. J. and Fessenden, J.S. (1983). Espectroscopía I: Infrarrojo y resonancia magnética nuclear. En *Química orgánica*. Grupo Editorial Iberoamérica, 320-372.
- Fwu-Long M.; Chin-Tsung, H.; Hsiang-Fa, L. and Hsing-Wen, S. (2006). Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3290-3296.
- Fujita, Ken-ichi; and Kubo, Isao. (2002). Antifungal activity of octyl gallate. *International Journal of food microbiology*, 79, 193–201.

- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N. and Zaritzky, N. E. (2009). Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. En: *Edible Films and Coatings for Food Applications*, (M. E. Embuscado y K. C. Huber, eds.), Pp. 169-210. Springer, New York.
- García P.C. and Gimeno S. M. (2010). Funcionalización enzimática de quitosano con ácido gálico y octil galato empleando peroxidasa de rábano. Caracterización de los materiales y evaluación de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Greener D. I.; and Fennema O., (1994). Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. En *Edible coatings and films to improve food quality*. J. M Krochan, E. A. Baldwin y M. Nisperos-Carriedo. Technomic Publishing 6-9
- Gennadios, A. and Weller, C. L. 1990. Edible films coating from wheat and corn protein. *Food Technology*. 44: 63-69.
- Gordon M.H. 2001. El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. (pp. 7- 21), en: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. Zaragoza: Ed. ACRIBIA.
- Guilbert, S.; and Biquet, B. (1996). Edible films and coatings. In: *Food Packaging Technology*. G Bureau, JL Multon (eds.). New York: VCH Publishers, Inc.
- Gunasekaran, S. and Mehmet, A. M. (2000). Dynamic oscillatory shear testing of food-selected application. *Trends in Food Science and Technology*. (11), 115-127.
- Han, H.J. (2000). Antimicrobial food packaning. *Food Technology* 54, 54-65.
- Hernández-Albiter, R. C.; Bravo-Luna, L.; Corona-Rangel, L.; Villa-Ayala, P.; Bautista-Baños, S.; y Barrera-Necha, L. (2005). Caracterización morfo-cultural y sintomatológica de dos aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. de papaya (*Carica papaya* L.). *Revista Mexicana de fitopatología*, 23 (3), 223 - 231.
- Hirai, A.; Odani, H.; and Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin* 26, 87-94.
- Hsu, Fu-Lan; Chen, Pin-Sheng; Chang, Hui-Ting; and Chang, Shang-Tzen. (2009). Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 543–547.
- Hwang, J. K. and Shin, H. H. (2000). Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*. 12 (3/4), 175-179.
- Infante, F.; Quilantán, J.; Rocha, F.; Esquinca, H.; Castillo, A.; Ibarra-Nuñez, G. and Palacio, V. (2011). Mango Ataulfo: Orgullo chiapaneco. CONABIO. *Biodiversitas*. 96, 1-5.

- INFOASERCA, Información económica y comercial para el sector agropecuario. La producción de pera en México; una carrera contra el tiempo. <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/035/ca035.pdf> Consulta Julio 2014.
- Itzincab-Mejía, L.; López-Luna, A.; Gimeno, M.; Shirai, K. and Bárzana, E. (2013). Enzymatic grafting of gallate ester onto chitosan: evaluation of antioxidant and antibacterial activities. *International Journal of Food Science and Technology*, doi:10.1111/ijfs.12181
- Kester, J.J. and Fennema, O.R. (1986). Edible Films and Coatings. A Review. *Food Technology*, 40, 47-59.
- Knaul, J. Z.; Hudson, S. M.; and Creber, K. A. M. (1999). Crosslinking of Chitosan Fibers with Dialdehydes : Proposal of a New Reaction Mechanism. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 37, 1079–1094.
- Kobayashi, S.; Uyama, H.; and Ohmae, M. (2001). Enzymatic Polymerization for Precision Polymer Synthesis. *Bulletin of the Chemical Society. Japan.*, 74, 613—635.
- Kobayashi S., and Higashimura H. (2003). Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in polymer science*, 28, 1015-1048.
- Krochta J. M., Baldwin E. A., and Nispero-Carriedo M. O. (1994). Edible and coatings: characteristic, formation, definitions, and testing methods. In: *Edible coatings and films to improve Food Quality*. Technomic Publishing CO INC USA
- Krochta, J.M. (1992). Control of mass transfer in food with edible coatings and films. In: *Advances in Food Engineering*, Singh, R.P. and Wirakartakusumah, M.A., Eds. CRC Press, Boca Raton, 517.
- Kubo, I.; Xiao P.; and Fujita K. (2001). Antifungal Activity of Octyl Gallate: Structural Criteria and Mode of Action. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters* (11) 347 – 350
- Kubo, I.; Xiao P.; and Fujita K. (2002). Anti-MRSA activity of alkyl gallates. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 12, 113-116.
- Kumar, G.; Smith, P. J.; and Payne, G. F. (1999). *Biotechnology and Bioengineering*, 63 (2), 154 -165.
- Kumar, G.; Bristow, J. F.; Smith, P. J.; and Payne, G. F. (2000). Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer*, 41, 2157–2168.
- Kumar M. N. V. R., Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., and Domb A. J. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem. Rev.* 104, 6017-6084
- Kuskoski, E.; Asuero, A.; Troncoso, A.; Mancini, J.; and Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia Tecnología Alimentos*, 25 (4),726-732.

- Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., and Gupta A. (2003). A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 1149-1158.
- Leceta, I., Guerrero, P., and De la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93, 339– 346.
- Lin, D., and Zhao, Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60-75.
- Liuver, A. and Roblejo, P. (2009). Universidad de La Habana : Instituto de Farmacia y Alimentos, Dpto. Alimentos. Tesis en opción al Título en Licenciatura en Ciencias Alimentarias.
- Mantilla C., Pedraza J., and Laverde D. (2008). Utilización de estudios de potencial zeta en el desarrollo de un proceso alternativo de flotación de mineral feldespático. *Dyna Año 75*, (154), 65 – 71.
- Maestro G. A., 2002. Reología de espesantes celulósicos para pinturas al agua: modelización y mecanismo de espesamiento asociativo. Tesis doctoral. Facultad de química. Universitat de Barcelona.
- Martínez-Camacho, A. P.; Cortez-Rocha, M. O.; Ezquerro-Brauer, J. M.; Graciano-Verdugo, A. Z.; Rodríguez-Félix, F.; Castillo-Ortega, M. M.; Yépiz-Gómez, M. S. and Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*. 82, 305 – 315.
- Mathew S.; and Abraham T. E.; (2008). Characterization of feluric acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food hydrocolloids*, 22, 826-835.
- Matsumoto, S. K.; Guerrero, L. I. and Hall, M. G. (1996). La quitina: ocurrencias, propiedades y aplicaciones. *Síntesis de investigación. Ciencia*
- McHugh, T. H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness
- McHugh, T.H and Krochta, J.M. (1994b). Sorbitol vs glycerol plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 841-850.
- McMurry, J. (2000). *Química orgánica*. Editorial Cengage Learning. 7ª edición.
- Miller, K.S., and Krochta, J.M., 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. *Trends in Food Science and Technology* 8 (7), 228–237.

- Mourya, V. K. and Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore *Reactive & Functional Polymers*, 68, 1013–1051.
- Muller, H. G. 1973. *Introducción a la reología de alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp 76-83.
- Nicell, J. A.; Saadi K. W. and Buchanan I. D. (1995). Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Biosource technology*, 54.5 -16.
- Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). Edible coatings and films based on polysaccharides. In: *Edible coatings and films to improve food quality*. JM Krochta, EA Baldwin, M Nisperos-Carriedo (eds.). pp. 305-355. Lancaster: Technomic Publishing Co.
- No, H.K.; Park N.Y.; Lee S.H.; Hwang H.J.; and Meyers S.P. (2002). Antibacterial Activities of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights on Spoilage Bacteria Isolated from Tofu. *Journal of Food Science*, 67, 41511. 1514.
- Nunes, C.; Maricato, E., Cunha, A.; Nunes, A.; Lopes da Silva, J. A., and Coimbra M. A. (2013). Chitosan–caffeic acid–genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. *Carbohydrate Polymers*, 91, 236– 243.
- Nyström B.; Kjoniksen A-L; Iversen Ch. (1999) Characterization of association phenomena in aqueous system of chitosan of different hydrophobicity. *Advances in colloid and interface science*, 79, 81-103.
- Olteanu C. E. (2007). Applications of functionalized chitosan. *Scientific study & research* , VIII (3) ISSN 1582-540X
- Park S.Y., Marsh K.S., and Rhim J.W. (2002). Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. *Journal of food Science*, 1 (67)194-197.
- Pasanphan, W.; and Chirachanchai, S. (2008). Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. *Carbohydrate Polymers*, 72, 169–177
- Pasanphan, W.; Buettner G. R., and Chirachanchai, S. (2010). Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydrate Research*, 345, 132– 140.
- Payet, L.; Ponton, A.; Grossiord, J-L.; and Agnely, F. (2010). Structural and rheological properties of chitosan semi- interpenetrated networks. *European Physical Journal E*, 32. 109 -118.
- Peesan, M.; Supaphol, P.; and Rujiravanit, R. (2005). Preparation and characterization of hexanoyl chitosan/poly lactide blend films. *Carbohydrate Polymers*, 60, 343–350.

- Pereda, M.; Amica, G., and Marcovich, N. E. (2012). Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1318– 1325.
- Peressini, D.; Bravin, B.; Lapasin, R.; Rizzotti, C.; and Sensidoni, A. (2003). Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersion. *Journal of food engineering*, 59, 25-32.
- Pillai, C.K.S.; Paul, W., and Sharma, Ch. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 34, 641–678
- Pitak N., and Rakshit S. K. (2011). Physical and antimicrobial properties of banana flour/chitosan biodegradable and self-sealing films used for preserving Fresh-cut vegetables *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2310 – 2315.
- Prior, R. L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rico-Peña, D. C. and Torres, J. A. (1991). Sorbic Acid and Potassium Sorbate Permeability of an Edible Methylcellulose-Palmitic Acid Film: Water Activity and pH Effects. *Journal of Food Science*, 56 (2), 497–499
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603–632.
- Roberts R. (2012) BPA exposure and health effects: educating physicians and patients. *American Family Physician*. 1, 85(11), 1040-4.
- Rodríguez-López, E. S.; González-Prieto J. M. and Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de fitopatología*, 27, 1, 53 - 63
- Rubilar, J. F.; Cruz, R. M. S.; Silva, H. D.; Vicente, A. A.; Khmelinskii, I.; and Vieira, M. C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115, 466–474.
- Ruíz –Ramos J. (2004). Caracterización reológica de emulsiones aceite-en-agua (O/W) estabilizadas con goma de mezquite y quitosano y su efecto en la permeabilidad de películas comestibles. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
- SAGARPA. (2012). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>.

- Sashiwa, H., and Aiba, S. (2004). Chemically modified chitin and Ch as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 29, 887-908.
- Sánchez-Domínguez, D.; Bautista-Baños, S., and Castillo, O. P. (2007). Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *Anales de biología*, 29, 23 – 32.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., and Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2102-2109.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Sebti, I., Martial-Gros, A., Carnet-Pantiez, A., Grelier, S., and Coma, V. (2005). Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *Journal of Food Science*, 70(2), M100–M104.
- Shaw, N.B., Monahan, F.J., O’Riordan, E.D. and O’Sullivan, M. (2002). Physical Properties of WPI Films Plasticized with Glycerol, Xylitol or Sorbitol. *Journal Food Sci.* 67: 164-167.
- Siller-Sánchez, A.; Alvarez-Pérez, O. B.; Aguilar; C. N.; and Rojas, R. (2013). Polifenoles de Cáscara de Mango (*Mangifera caesia* var. Ataulfo): Una Alternativa Antioxidante y Antimicrobiana. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5 (10), 8-11.
- Silva-Weiss, A.; Bifani, V.; Ihl, M.; Sobral, P.J.A.; and Gómez-Guillén M.C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31, 458-466.
- Siripatrawan, U. and Harte B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 24 : 770 – 775.
- Skoog, D. A.; West, D. M.; and Holler, F. J. (1995). *Química Analítica Sexta edición* Editorial Mc. Graw Hill.
- Snowdon, A. (1990). *A color Atlas of Post-Harvest Diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 1: General introduction. Wolfe Scientific.
- Soliva F.R. and Martín O. (2001). Envasado de alimentos mediante recubrimientos comestibles. *Alimentaria*, Septiembre. 325: 29-37.

- Sothornvit, R and Krochta, J.M. (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 6298-6302.
- Sperling, L. H. (2006). *Introduction to Physical Polymer Science*, fourth ed. John Wiley and Sons, Inc., New Jersey.
- Steffe, J.F. (1992). "Rheological Methods in Food Process Engineering", Freeman Press, USA.
- Sobahi, T. R. A.; Abdelaal, M. Y.; and Mohamad, S I. M. (2011). Chemical modification of Chitosan for metal ion removal. *Arabian Journal of Chemistry*. doi:10.1016/j.arabjc.2010.12.011.
- Sun, X.; Wang, Z.; Kadouh, H.; and Zhou, K. (2014). The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT - Food Science and Technology*. 57, 83 - 89
- Synowiecki, J.; and Kkhateeb, N. A. A. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2): 142-171.
- Teotia, A.; Ikram, S.; and Gupta, B. (2012). Structural characterization of chitosan and oxidized carboxymethyl cellulose based freeze-dried films. *Polymer Bulletin*, 69 (2), 175-188
- Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 14: 71-78.
- Tripathi, S.; Mehrotra, G.K.; and Dutta, P.K. (2010). Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. *Carbohydrate Polymers* 79, 711–716.
- Tsai, G. J., Su, W. H., Chen, H. C., and Pan, C. L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish
- Vachoud L. Chen T., Payne F. G., and Vazquez-Duhalt R. (2001). Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme and microbial technology*. 29. 380 -385.
- Valencia-Chamorro, S. A.; Palou, LI.; Del Río, M. A.; and Pérez-Gago, M. B. (2011). Critical reviews in food science and nutrition. 9, (51), 872 – 900.
- Valera, A.; Materano, W.; Maffei, M.; Zambrano, I.; and Quintero J. (2011). Uso de recubrimientos comestibles y baja temperatura para mantener la calidad de frutos de mango ' Bocado ' durante el almacenamiento. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*. 28 Supl. 1: 600-608.

- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., and González-Martínez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 164–171.
- Vinšová, J. and Vavřítová E. (2011). Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities – a Review. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 3596 – 3607.
- Vu, K.D.; Hollingsworth, R.G.; Leroux, E.; Salmieri, S. and Lacroix M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44, 198–
- Wong D. W. S, Gastineau A. F., Gregorski S.K., Tillin J.S., and Pavlath E. A. (1992). Chitosan-Lipid Films: Microstructure and Surface Energy. *J. Agric. Food Chem.* 40, 540-544.
- Wu, J.; Zhong, F.; Li Y.; Shoemaker C.F.; and Xia W. (2013). Preparation and characterization of pullulan-chitosan and pullulan-carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocolloids*, 30, 82 – 91.
- Xiao-Yi H.; Jian-Ping B.; Huai-Tian B.; Gang-Biao J. and Ming-Hua Z. (2011). Removal of anionic dye eosin Y from aqueous solution using ethylenediamine modified chitosan. *Carbohydrate Polymers* 84, 1350–1356.
- Xu Y. X., Kim K. M. Hanna M. A. and Nug D. (2004). Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial crops and products*. 21(2), 185-192.
- Xu, Y.X.; Kim, K.M.; Hanna, M.A.; and Nag, D., (2005). Chitosan–starch composite film. Preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21, 185–192.
- Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Haggard, W. O.; and Bumgardner, J. D. (2011). Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials*. 4, 1399-1416; doi:10.3390/ma4081399.
- Zhang D., and Quantick P.C. (1997). Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 195-202.
- Zhang, Y.; Peng, J. and Wang, J. (2013). Preparation and characterization of chitosan edible film. *Applied mechanics and materials*. 291-294, 778-781.