



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PELÍCULA  
COMESTIBLE A BASE DE ALMIDÓN Y QUITOSANO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ANDREA REYES BASURTO**

**DIRIGIDA POR**

**DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
UNA PELÍCULA COMESTIBLE A BASE DE  
ALMIDÓN Y QUITOSANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**ANDREA REYES BASURTO**

DIRIGIDA POR

**DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

\_\_\_\_\_

DIRECTOR

DRA. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

\_\_\_\_\_

SINODAL

DRA. ELVIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

\_\_\_\_\_

SINODAL

DRA. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ

\_\_\_\_\_

SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Películas comestibles	1
1.2 Almidón	2
1.3 Almidón modificado	3
1.3.1 Almidón ceroso	4
1.3.2 Almidón oxidado	5
1.3.3 Almidón acetilado	5
1.4 Películas comestibles a base de almidón	5
1.5 Quitosano	6
1.6 Clasificación de quitosano	7
1.7 Películas a base de quitosano	9
1.8 Plastificantes	9
1.9 Empaques nanoestructurados	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 General	13
3.2 Específicos	13
4. METODOLOGÍA	14
4.1 Materiales	14
4.2 Métodos	14
4.2.1 Preparación de películas de quitosano	14
4.2.2 Preparación de películas de almidón modificado	14

4.2.3	Elaboración de películas comestibles a basge de la mezcla quitosano-almidón	15
4.2.4	Caracterización física	15
4.2.4.1	Espesor	15
4.2.4.2	Permeabilidad al vapor de agua	15
4.2.4.3	Propiedades mecánicas (Dureza y Elasticidad)	17
4.2.4.4	Solubilidad en agua	19
4.2.4.5	Rugosidad	
4.2.4.6	Color	20
4.2.5	Caracterización química	20
4.2.5.1	Espectroscopia Raman	20
4.3	Análisis estadístico	22
5.	RESULTADOS	233
5.1	Caracterización física	233
5.2	Espesor y contenido de humedad	255
5.1	Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua	266
5.2	Propiedades mecánicas (Dureza y Elasticidad)	27
5.3	Rugosidad	28
5.4	Color	31
5.5	Caracterización química	33
5.5.1	Espectroscopia Raman	33
6.	DISCUSIÓN	39
6.1	Caracterización física	39
6.1.1	Espesor y Contenido de humedad	39
6.1.3	Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua	40
6.1.4	Rugosidad (Ra y Rq)	42
6.2	Propiedades mecánicas (Dureza y Elasticidad)	43
6.1.1	Color	44

6.3 Caracterización química (Espectroscopia Raman)	44
7. CONCLUSIÓN	47
8. REFERENCIAS	488

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características generales de las películas comestibles obtenidas	23
2. Espesor y porcentaje de humedad de películas comestibles	25
3. Permeabilidad y porcentaje de soubilidad de las películas comestibles	26
4. Dureza y módulo elásticos de las películas comestibles	28
5. Rugosidad de las películas comestibles	29
6. Parámetros de color de las películas comestibles	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura lineal de la molécula de amilosa (McDonagh y col., 2012)	3
2. Estructura de la molécula de amilopectina	3
3. Estructura química del quitosano (Guibal, 2005)	7
4. Permeabilidad al vapor de agua	15
5. Curva de carga y descarga	17
6. Punta Berkovich de diamante de geometría piramidal	18
7. Espectroscopio Raman acoplado a un microscopio	21
8. Película de quitosano	23
9. Película de almidón oxidado	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
10. Película de almidón acetilado	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
11. Película de almidón ceroso	244
12. Película de quitosano-almidón oxidado	24
13. Película de quitosano-almidón ceroso	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
14. Película de quitosano-almidón acetilado	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
15. Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles	27
16. Micrografía de películas comestibles : A) Mezcla Quitosano- Almidón ceroso B) Almidón ceroso. C) Quitosano	29
17. Micrografía de películas comestibles: A) Mezcla Quitosano- Almidón oxidado B) Almidón oxidado. C) Quitosano.	30
18. Micrografía de películas comestibles: A) Mezcla Quitosano- Almidón acetilado. B) Almidón acetilado. C) Quitosano	31
19. Espectroscopia RAMAN de mezcla Quitosano- Almidón acetilado y sus componentes individuales	35
20. Espectroscopia RAMAN de mezcla Quitosano- Almidón oxidado y sus componentes individuales	36
21. Espectroscopia RAMAN de mezcla Quitosano- Almidón ceroso y sus componentes individuales	37
22. Espectroscopia RAMAN de las mezclas quitosano con los tres tipos	





## Resumen

El desarrollo de las películas comestibles ha sido de gran interés para conservación de alimentos, permitiendo reducir el uso de materiales de empaque de plástico, los cuales al ser derivados del petróleo no son renovables y contaminan el medio ambiente. Las películas comestibles pueden ser elaboradas a partir de proteínas, lípidos, carbohidratos o combinación de éstos. El almidón es un excelente material para la elaboración de películas por ser renovable, abundante y de bajo precio, sin embargo, tiene como limitante alta permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas pobres. Se han realizado modificaciones al almidón para mejorar su resistencia al pH, temperatura y evitar la retrogradación. El quitosano ha sido utilizado para la formación de películas por sus propiedades antifúngicas, su flexibilidad, alta permeabilidad al vapor de agua, pero con una baja permeabilidad al O<sub>2</sub>. El objetivo de este trabajo fue elaborar una película comestible a base de la mezcla de quitosano y almidón modificado (ceroso, acetilado y oxidado) y establecer la relación entre sus propiedades estructurales y físicas, mediante el uso de nanotecnología y espectroscopia. Se comprobó la interacción de los diferentes tipos de almidón con el quitosano. Las películas comestibles de las mezclas quitosano-almidón presentaron mejores propiedades de barrera y mecánicas que las de ambos componentes de manera individual. La película de Q-AO presentó los menores valores de espesor ( $0.074 \pm 0.007$  mm), contenido de agua ( $11.533 \pm 0.854$  %), % de solubilidad ( $26.77 \pm 1.40$ ) y PVA ( $1.18 \pm 0.48 \times 10^{-9}$  g/(s mPa) que las demás películas de las mezclas, así mismo presentó menor dureza ( $2.30 \pm 0.19$  MPa), rugosidad ( $R_a=3.972 \pm 0.33$  nm y  $R_q=3.20 \pm 0.41$  nm) y fue la más elástica ( $0.11 \pm 0.06$  GPa) junto con la película de Q-AA ( $0.09 \pm 0.01$  GPa).

Palabras clave: QO=Quitosano, AO=Almidón oxidado, AC=Almidón ceroso, AA=Almidón acetilado, PVA=Permeabilidad al vapor de agua.

## 1. ANTECEDENTES

El desarrollo de empaques plásticos para alimentos ha permitido aumentar su vida de anaquel, sin embargo, el uso excesivo de estos ha dado lugar a serios problemas ambientales, debido a que la mayoría de estos materiales son derivados del petróleo, tales como polietileno (PE), polipropileno (PP), tereftalato de polietileno (PET) y poliamida (PA), lo que los hace no biodegradables y de naturaleza no renovable (Ge y col., 2015), esta creciente conciencia ambiental, junto con el aumento de los precios del petróleo ha llevado a un mayor interés por parte de las industrias de alimentos, embalaje y distribución para el desarrollo de los conceptos de embalaje de base biológica, es por ello que el estudio de las películas comestibles ha adquirido un gran interés, ya que representan un posible sustituto a dichos empaques, y a su vez proporciona una nueva alternativa para la aplicación de hidrocoloides, siguiendo las tendencias mundiales de la preservación del medio ambiente (Peelman y col., 2014; Fakhouri y col., 2015).

### 1.1 Películas comestibles

Una película comestible se define como una matriz compuesta por biopolímeros como proteínas (caseína, gnetina, zeína y gluten), lípidos (ceras), carbohidratos (almidón y quitosano) o la combinación de estos (Santacruz y col., 2015), que son aplicadas a los alimentos para aumentar su vida de anaquel, así como conservar sus propiedades organolépticas (Escamilla y col., 2013). Las películas comestibles son un vehículo de aditivos (saborizantes, colorantes, antimicrobianos) y actúan como una barrera a gases y vapor de agua manteniendo las características del alimento (Chiumarelli y col., 2012).

Actualmente el estudio de este tipo de empaques se ha enfocado principalmente en mejorar sus características con la finalidad de obtenerlos con propiedades similares a los de los materiales sintéticos convencionales, tales como alta resistencia mecánica, suavidad, ligereza, transparencia y resistencia al agua, entre otras (Razavi y col., 2015).

Las películas elaboradas a base de carbohidratos, proporcionan buenas propiedades mecánicas y son barreras eficientes contra compuestos de baja polaridad; su selectividad en cuanto a permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono, condiciona la creación de atmósferas modificadas siendo el carbohidrato más utilizado para la elaboración de películas el almidón, debido principalmente a que es renovable, barato, abundante y relativamente fácil de manejar (Aguilar 2005, Gutiérrez y col., 2015).

## 1.2 Almidón

El almidón es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidos por un enlace glucosídico. El enlace glucosídico es estable bajo condiciones alcalinas y es hidrolizado bajo condiciones ácidas. Al final de la cadena del polímero se encuentra un grupo aldehído latente conocido como grupo extremo reductor. La relación de amilosa-amilopectina varía según el origen del almidón. La amilosa es un polímero lineal formado por alrededor de 6000 unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 (Figura 1), estas cadenas están localizadas en la zona amorfa del centro del gránulo de almidón (Wang y col., 2014); mientras La amilopectina está formada por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 (Figura 2). Las moléculas de amilopectina son significativamente más grandes que las moléculas de amilosa; algunas contienen entre 10.000 y 20'000.000 unidades de glucosa. El peso molecular de la amilosa está entre 0,1 y un millón de g/mol. Y el de la amilopectina está entre 10.000 a 1.000millones g/mol (Ruiz, 2006). La amilosa es la responsable de las propiedades de formación de geles y resistencia a la cizalla, por otro la amilopectina es más estable que la amilosa debido a los limitados enlaces de hidrógeno, que le confieren fluidez, alta viscosidad y elasticidad a las pastas y espesantes (Tofiño y col., 2006). El almidón de maíz contiene un 28% de amilosa con un grado de polimerización (DP) de 1000 y un 72% de amilopectina con un DP de  $2 \times 10^6$  DP (McDonagh y col., 2012).

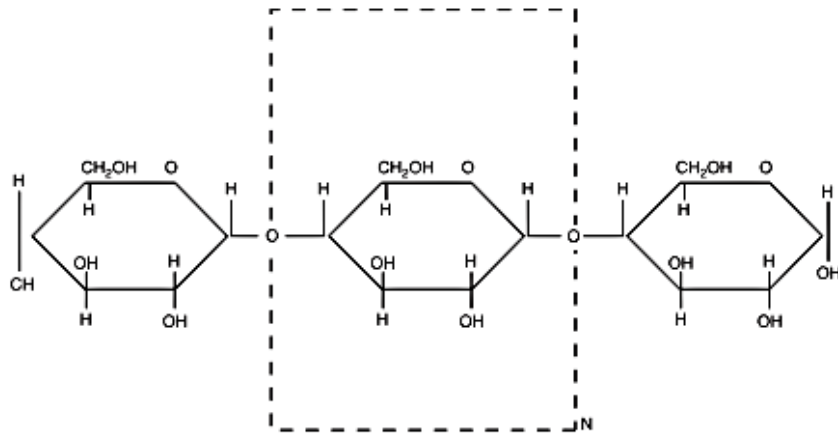


Figura 1. Estructura lineal de la molécula de amilosa (McDonagh y col., 2012).

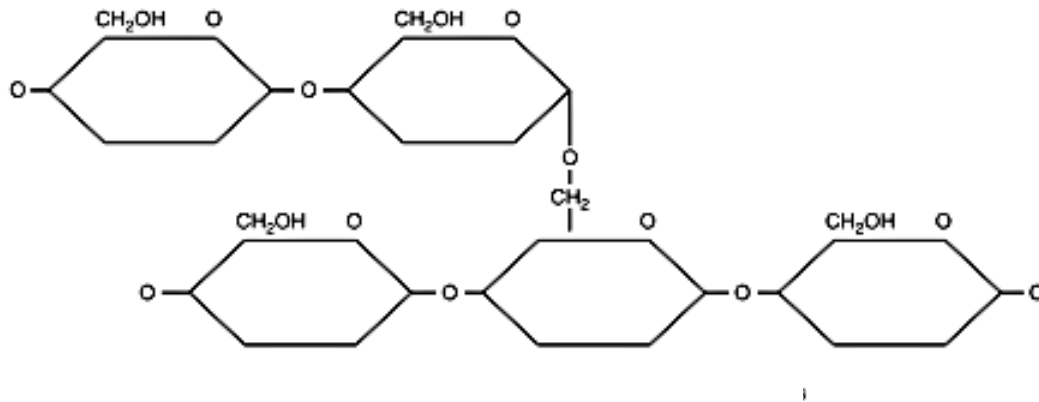


Figura 2. Estructura de la molécula de amilopectina (Peñaranda-Contreras y col., 2008).

Los almidones nativos presentan ciertas limitaciones debido a que son susceptibles a altas temperaturas, pHs ácidos, tienen bajas resistencias a altos esfuerzos cortantes y presentan fenómenos de retrogradación y sinéresis. Debido a esto es necesario recurrir a modificaciones físicas o químicas para evitar estos problemas (Rincón y col., 2007).

### 1.3 Almidón modificado

Los almidones son modificados para brindarles ciertas propiedades requeridas en un proceso particular de un alimento y aumentar su vida de anaquel. Existen

diferentes tipos de modificación del almidón nativo con el objetivo de cambiar ciertas propiedades como: temperatura de gelatinización, viscosidad, tendencia a la retrogradación, carácter iónico e hidrofílico.

Tomando en cuenta la temperatura de gelatinización, si se calienta una suspensión de los gránulos de almidón en agua, esta penetra en los gránulos provocando un hinchamiento. Si la temperatura de la suspensión sobrepasa la temperatura de gelatinización del almidón, se produce una masa viscosa y los gránulos pierden su microscopía, forma y apariencia única que no puede recuperarse después por un enfriamiento a temperatura ambiente. Como los gránulos de almidón se hidratan e hinchan al estar en agua caliente, el índice de refracción de los gránulos se aproxima al del agua y la solución se vuelve turbia. Generalmente la temperatura de gelatinización en los almidones modificados es inferior que la de los almidones nativos (McDonagh, 2012). Cada almidón tiene una tendencia diferente a la retrogradación, la cual se relaciona con el contenido de amilosa así como con su longitud y el estado de dispersión de las cadenas lineales, por lo que a mayor contenido de amilosa, mayor posibilidad de retrogradación (Rincón y col., 2007).

### 1.3.1 Almidón ceroso

El almidón ceroso se produce por transformación y mutagénesis del gene *GBSS* especialmente en cereales, su nombre deriva de la apariencia cerosa del endospermo en un corte longitudinal del grano. También es útil en la industria de películas y adhesivos por su baja retrogradación (Tofiño, 2006), este tipo de almidón se caracteriza por su composición (100% de amilopectina), presenta alta viscosidad y baja tendencia a la retrogradación (Lu y col., 2014). Los almidones cerosos comienzan a espesar a temperaturas más bajas, pero espesan menos y sufren menos retrogradación que las variedades no céreas, y debido a que el almidón ceroso carece de amilosa no gelifica, la cristalinidad de la estructura del almidón depende del ordenamiento de las cadenas de amilopectina, por lo que, los gránulos de almidón céreo tienen un alto grado de cristalinidad. Este tipo de almidón se utiliza como materia prima para la elaboración de nanopartículas

monocristalinas, sin embargo, se requieren soluciones ácidas que disuelvan las regiones desordenadas de modo que, los residuos insolubles en agua que son altamente cristalinos, puedan convertirse en una suspensión estable de nanopartículas (García y col., 2009).

### 1.3.2 Almidón oxidado

El almidón oxidado se puede obtener a partir de una oxidación con hipoclorito de sodio. La oxidación reduce la asociación de las moléculas de amilosa y como resultado los grupos hidroxilo en las moléculas del almidón son oxidados a grupos carbonilo y posteriormente a grupos carboxilo y su número indica el nivel de oxidación (BeMiller, 2003). Debido a esto hay una disminución en el peso molecular, viscosidad y retrogradación, así como un aumento en la transparencia de los geles y del poder hidrofílico (Díaz y col, 1999).

### 1.3.3 Almidón acetilado

La acetilación del almidón se realiza a partir de una esterificación con anhídrido acético, el número de grupos acetilo incorporados a la molécula depende de la fuente del almidón, concentración del reactivo, tiempo de reacción, proporción amilosa-amilopectina, pH y la presencia de un catalizador (Rincón y col., 2007).

Los grupos acetilo introducidos en las cadenas de almidón confieren propiedades emulsificantes a las moléculas del mismo, así como resistencia al agua y una menor viscosidad (García-Tejeda y col., 2015), interrumpen las interacciones entre cadenas externas de amilopectina y las cadenas de amilosa, lo cual impide la nubosidad y la sinéresis en almidón, tiene temperatura de gelatinización menor, mayor pico de viscosidad y retrogradación reducida tras el enfriamiento en comparación al almidón nativo (Wilkins y col., 2003).

## 1.4 Películas comestibles a base de almidón

De estos componentes, la amilosa es la responsable de formar películas. La funcionalidad de estas películas depende de la proporción de amilosa y

amilopectina del gránulo; si el porcentaje mayor es de amilosa, se obtendrán películas con una alta flexibilidad, sin embargo, si el porcentaje de amilopectina es mayor, las estructuras ramificadas de amilopectina formarán películas con propiedades mecánicas pobres (Tharanathan, 2003). Las películas de almidón se usan principalmente para disminuir el intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el alimento, más que para retardar la pérdida de humedad. El carácter hidrofílico de estas películas les confiere un aspecto quebradizo. En el área de alimentos las películas de almidón se usan principalmente para disminuir el intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el alimento; las películas de almidón se han aplicado para la conservación de frutas como el mango fresco (Ducamp-Collin y col., 2009) y vegetales como el tomate rojo (Hernández y col., 2011).

Como resultado de propiedades mecánicas y de barrera pobres de las películas a base de almidón nativo, se ha estudiado la modificación y fuentes de este para combatir las debilidades en estas propiedades (Al-Hassan y col., 2012).

### 1.5 Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal (Figura 3) obtenido por la desacetilación parcial de la quitina, polímero biodegradable y no tóxico (Escamilla y col., 2013). La quitina es un polímero natural abundante que es encontrado en el exoesqueleto de los crustáceos, células fúngicas y otros materiales biológicos. El quitosano consiste en unidades  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa y  $\beta$ -(1-4)-2-amino-D-glucosa (Elsabee y col., 2013). Presenta actividad antimicrobiana contra un amplio rango de microorganismos patógenos presentes en los alimentos lo cual lo califica como un conservador natural (Kanatt y col., 2007). Una de las propiedades clave del quitosano es el de ser una molécula catiónica, lo que lo hace tener la capacidad de actuar como floculante, humectante y quelante. Notablemente y debido al grupo amino que lo compone, también atrapa metales pesados, insecticidas y policarbonatos (Bautista-Baños y col., 2005)

Se ha reportado que el quitosano tiene actividad antifúngica, la cual se ve afectada por el peso molecular, el grado de desacetilación, condiciones de reacción como la

temperatura y pH, la dosis aplicada, la naturaleza policatiónica del quitosano, longitud de la cadena de este polímero, efecto inhibitorio en la síntesis de enzimas macerantes producida por los hongos (la poligalacturonasa, pectato liasa y celulasa) y la formación de barreras estructurales (papilas, lignificación, tilosas) que impiden la penetración de los hongos en el hospedero (Bautista-Baños y col., 2005; Shun-Hsien y col. 2015).

Como se mencionó anteriormente el quitosano es considerado como un antimicrobiano natural, inhibe el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias tales como *Aspergillus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Mucor racemosus*, *Byssochlamys spp.*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, y *Lactobacillus fructivorans*. Se ha aplicado para la conservación de diversos alimentos como frutas, carne, pescado, entre otros (Davidson y col., 2015).

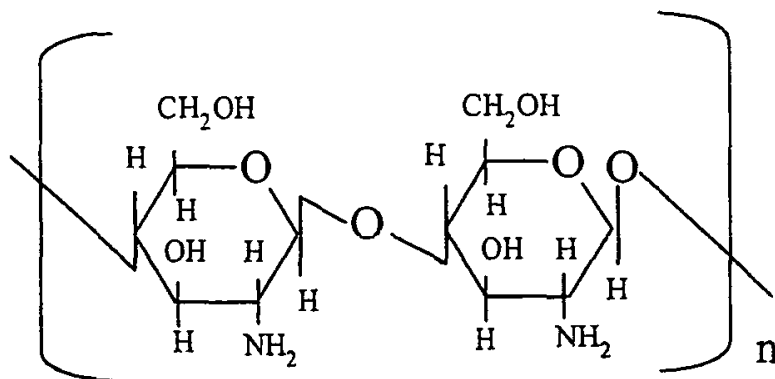


Figura 3. Estructura química del quitosano (Guibal, 2005).

### 1.6 Clasificación de quitosano

El proceso de obtención del quitosano involucra un tratamiento ácido, seguido en un tratamiento alcalino, una etapa de decoloración y posteriormente un nuevo tratamiento alcalino para producir la desacetilación de la quitina. Este proceso se ve afectado por diversos factores (concentración del álcali, temperatura, fuente de quitina, tamaño de partícula) que influyen en el quitosano obtenido. El quitosano puede clasificarse como de alto o bajo peso molecular y dependiendo su grado de



desacetilación. El quitosano comercial generalmente tiene un grado de desacetilación (DD) de 70 a 95% y un peso molecular de  $10^4$  a  $10^6$  g/mol (Bof y col., 2015).

La despolimerización del quitosano produce una mezcla de oligómeros de quitosano y quitosanos de bajo peso molecular los cuales difieren en el grado de polimerización. Estos productos consisten en unidades glucosamina acetilada y anillos unidos por enlaces 1,4-glicosídicos. Los grupos hidroxilo, amino, y grupos amino acetilados de oligómeros y quitosanos de bajo peso molecular interactúan con receptores de células que desencadenan una cascada de reacciones interconectadas con organismos vivos presentando una respuesta antiinflamatoria, anti-carcinogénica, antimicrobiana, antioxidante, neuroprotectora y con efecto inmunoestimulativo (Tishchenko y col., 2011).

La actividad antimicrobiana del quitosano se ve afectada por el, el grado de desacetilación, el peso molecular, así como las condiciones de reacción como la temperatura y pH. Se ha reportado que el aumento en el grado de desacetilación y la carga positiva del quitosano así como condiciones ácidas y temperaturas altas favorecen la actividad antimicrobiana del quitosano.

Dado que el peso molecular del quitosano influye en la actividad antimicrobiana, se ha reportado que en medio ácido (pH 5.0 y 6.0) la actividad antimicrobiana aumenta cuando el peso molecular incrementa; sin embargo, a pH 7.0 el quitosano con un peso molecular  $>29.2$  kDa pierde actividad, por lo que hay una relación entre el pH y el peso molecular del quitosano en la actividad antimicrobiana (Chang y col. 2015).

La actividad antimicrobiana también se debe a las fuerzas electrostáticas entre grupos amino protonados del quitosano los cuales interaccionan con los grupos fosforilo y los fosfolípidos que componen la membrana celular. El número de grupos amino protonados aumenta con el grado de desacetilación del quitosano (Elsabee y col., 2013).

## 1.7 Películas a base de quitosano

En contraste con el almidón, las películas de quitosano muestran valores de permeabilidad de oxígeno extremadamente bajos, humedad relativa baja, y permeabilidad al vapor de agua alta (Jost y col., 2014).

Debido a las propiedades antimicrobianas y capacidad de formar películas, el quitosano se ha utilizado como material de empaque para la conservación de alimentos. Un empaque antimicrobiano es considerado como una forma de empaque activo. Las películas a base de quitosano presentan buenas propiedades mecánicas y una permeabilidad alta al CO<sub>2</sub> y baja al O<sub>2</sub> (Ma y col., 2015), sin embargo, al tener una alta permeabilidad al vapor de agua presenta una limitante en su uso ya que el control de esta propiedad es deseable en la mayoría de los alimentos, hay una mayor fuerza de enlace entre el agua y grupos hidroxilo del quitosano que con los grupos amino (Elsabee y col., 2013).

## 1.8 Plastificantes

Las películas elaboradas a base de almidón no tienen propiedades termoplásticas, por lo que es necesario adicionarle algún plastificante y un proceso térmico (Moreno y col., 2015). Los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular y han sido incorporados en la formulación de las películas para reducir las interacciones entre los polisacáridos lo que hace a una película rígida y quebradiza, y así obtener una película flexible. La capacidad del plastificante para reducir las interacciones entre polímeros depende del número de grupos hidroxilo libres y la compatibilidad del plastificante con el polímero. Los plastificantes se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de solubilidad en polímeros altamente concentrados, los plastificantes solubles, capaces de gelificar un polímero rápidamente bajo una gama de temperatura normal se consideran como primarios, mientras que se considera un plastificante secundario a todos aquellos con capacidades de gelificación más bajas y requieren ser mezclados con plastificantes primarios para mejorar las propiedades del producto o reducir los costos (Nur-Hanani y col., 2013)

Para la formación de películas comestibles, los plastificantes más utilizados son el glicerol, polietilenglicol, sorbitol y algunos azúcares, de los cuales el glicerol es el plastificante más utilizado debido a que es muy estable, compatible con las cadenas de biopolímeros y brinda flexibilidad y fácil manejo a las películas, sin embargo al ser un compuesto altamente higroscópico las películas presentan un aumento en el contenido de humedad, lo que a la vez provoca que tengan propiedades de barrera pobres (Domínguez-Courtney y Jiménez-Munguía, 2012).

### 1.9 Empaques nanoestructurados

Como se mencionó, las características de las películas comestibles son las que determinan la aplicación de éstas, dentro de las propiedades comúnmente evaluadas se puede mencionar la permeabilidad al vapor de agua, permeabilidad a gases, fuerza de tensión, morfología entre otras; sin embargo actualmente el interés por desarrollar empaques nanoestructurados con la finalidad de obtener empaques con mejores propiedades, no obstante son pocos los estudios que se han reportado respecto a este tema, dentro de las técnicas utilizadas para la caracterización de películas comestibles a nivel nano se puede mencionar la microscopía de fuerza atómica, y la nanoindentación, elipsometría entre otras.

Por nanotecnología se entiende como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras o materiales de la forma y tamaño nanoescala en el rango de 1-100 nm. Ésta tecnología ha sido de gran importancia en la industria de los alimentos por la gran diferencia que aporta a los materiales que son utilizados en embalaje incluyendo el envasado proporcionando una mayor vida útil a los alimentos (Escamilla-García y col., 2015).

Actualmente, el extender la vida de anaquel de los alimentos, así como su seguridad y calidad ha ido en aumento, utilizando empaques que no dañen al medio ambiente, estos aspectos han sido el enfoque del desarrollo y aplicación de la nanotecnología en los empaques de los alimentos. Los productos nano habilitados incluyen nanocompuestos, capas de barrera, componentes activos y funciones inteligentes. Un envase activo tiene más funciones además de ser inerte

y aislar el producto del ambiente. Los nanocompuestos incorporados tienen como objetivo brindar propiedades de barrera, fuerza mecánica, estabilidad a la humedad y temperatura, así como durabilidad al empaque (Park, 2013).

El nanoindentador ha sido utilizado para la determinación de la dureza y módulo elástico de películas comestibles. Este instrumento registra la curva de carga-descarga indicando la profundidad de penetración del indentador en el material (Fabra y col., 2011). Las ventajas de esta técnica para la caracterización de películas comestibles, es la obtención de valores fiables de dureza y módulo elástico, incluso cuando las películas tienen pequeños espesores y se pueden llevar a cabo mediciones puntualizadas, al realizar este tipo de análisis es importante considerar el grado de hidratación del material, ya que las propiedades mecánicas evaluadas dependen de esta variable y también determinará los parámetros de prueba adecuados para establecer el punto de contacto entre la punta y la superficie del material. La ubicación del punto de contacto incorrecta puede generar valores de las propiedades mecánicas subestimados y sobreestimados (Arzate-Vázquez, y col., 2015).

La microscopía de fuerza atómica se ha empleado para el análisis de la morfología de la superficie de películas, donde se obtienen los valores de rugosidad y perfiles de sección transversal (Antoniou y col., 2015).

## **2. HIPÓTESIS**

Las películas comestibles a base de la mezcla quitosano-almidón presentarán mejores propiedades mecánicas y de barrera que las elaboradas a base de los componentes puros, así mismo, técnicas de microscopía y espectroscopia permitirán relacionar las interacciones químicas entre los compuestos utilizados y sus propiedades físicas.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 General

Elaborar una película comestible a base de una mezcla de quitosano y almidón y su caracterización mediante técnicas de micro y nanotecnología.

#### 3.2 Específicos

- Elaborar películas comestibles, a base de quitosano y tres tipos de almidón modificado.
- Caracterizar las películas comestibles.
- Establecer la relación entre las interacciones químicas de los compuestos que conforman las películas comestibles con sus propiedades físicas.
- Elegir la película comestible con las mejores propiedades para su aplicación como recubrimiento en alimentos.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

Quitosano de alto peso molecular (grado de desacetilación  $\geq 75\%$ , Sigma-Aldrich, C3646-500G), ácido láctico (85%, Fermont, PQ01511), Glicerol ( $\geq 99.5\%$ , Sigma-Aldrich, G9012-500ML), Tween 80 (Sigma-Aldrich, P1754-1L), almidón oxidado (CPIngredientes, RD606), acetilado (CPIngredientes, Snow Flake 6702), ceroso (CPIngredientes, Almidón waxy).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparación de películas de quitosano

Se elaboró una solución de quitosano (1% p/v) en ácido láctico (0.5% v/v), se agitó durante 60 min y una temperatura de 80°C utilizando una parrilla (Barnstead, SP131325, IA, E.U.A.), posteriormente se adicionó glicerol como plastificante en una proporción 1:1 (quitosano:glicerol) y Tween 80 (0.2% p/v), la mezcla se agitó sin calentamiento durante 10 min. Finalmente, la solución se desgasificó durante 15 min utilizando una bomba de vacío (Fisher Scientific M8C, California, E.U.A.). La formación de la película se realizó por el método de vaciado en caja, para ello se adicionaron 72 mL de la solución en cajas (11x15.5 cm), el secado se realizó durante 24 h a 60 °C y 50% HR en una cámara climática (KBF 115 de BINDER, Tuttlingen, Alemania) (Bourbon y col., 2011).

#### 4.2.2 Preparación de películas de almidón modificado

Se preparó una solución de almidón (oxidado, acetilado y ceroso por separado) (3.5% p/v) en agua destilada. Se mantuvo en agitación a 90 °C durante 30 min y se desgasificó para eliminar aire, la formación de la película se realizó por el método de vaciado en caja, adicionando 72 mL de la solución en una placa (11 x 15 cm) y se secaron en una cámara climática durante 24 h, a una humedad relativa (HR) de 50%, a 60°C (Mehdizadeh y col., 2012).

#### 4.2.3 Elaboración de películas comestibles a base de la mezcla quitosano-almidón

Se preparó la solución de quitosano y las tres soluciones de almidón (oxidado, acetilado, ceroso) como se describieron anteriormente y se realizó una mezcla de quitosano con cada una de las soluciones de almidón a una proporción 75:25 (quitosano:almidón), teniendo así 3 mezclas quitosano-almidón oxidado, quitosano-almidón acetilado, quitosano-almidón ceroso. Se desgasificaron cada una de las mezclas y se formaron bajo las mismas condiciones que las películas anteriores.

#### 4.2.4 Caracterización física

##### 4.2.4.1 Espesor

El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo, 293-185, Japón).

##### 4.2.4.2 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó de acuerdo al método gravimétrico estándar ASTM E 96-80. Para esta prueba se utilizaron celdas de permeabilidad con un diámetro interno de 3.2 cm y una altura de 15.3 cm entre la celda y la tapa del desecador (Figura 4).

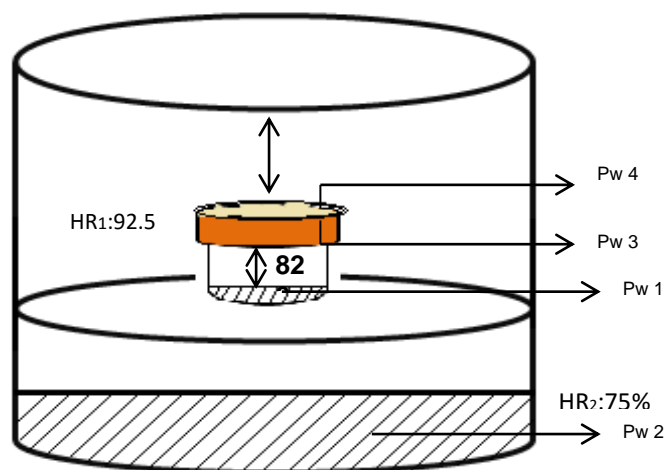


Figura 4. Permeabilidad al vapor de agua



Dentro de las celdas se colocó una solución saturada de KNO<sub>3</sub> (HR= 92.5%, a T= 25 °C), posteriormente se recortaron las películas en una forma circular (Φ= 4 cm) y se colocaron en la superficie de la celda. Finalmente, las celdas de permeabilidad se colocaron en un desecador el cual contenía una solución saturada de NaCl (HR= 75%, T=25°C y se registraron las variaciones de peso de las celdas de permeabilidad hasta llegar a peso constante, la permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtuvo a partir de la Ecuación 1 (Alvarado-González y col., 2010; Escamilla-García y col., 2013)

$$PVA = \frac{\Delta W}{tA} * \frac{L}{\Delta P} \dots\dots\dots (1)$$

En donde ΔW es la variación del peso de la celda de permeabilidad (g), t es el tiempo que dura la prueba (s), A es el área de contacto de la película comestible (m<sup>2</sup>), L es el espesor de la película (mm) y ΔP es la diferencia de presiones (Pa).

Una vez calculado la PVA, este valor se corrigió por medio de las metodologías reportadas por Gennadios y col., (1994).

$$P_{w1} = P_0 * \frac{HR_1}{100} \dots\dots\dots (2)$$

$$P_{w2} = P_0 * \frac{HR_2}{100} \dots\dots\dots (3)$$

$$P_{w3} = P_T - (P_T - P_{w1}) \frac{PVA * R * T * h_i}{P_T * D} \dots\dots\dots (4)$$

$$P_{w4} = P_T - (P_T - P_{w2}) \frac{PVA * R * T * h_0}{P_T * D} \dots\dots\dots (5)$$

$$Permeancia_c = Permeancia_m * \frac{P_{w1} - P_{w2}}{P_{w3} - P_{w4}} \dots\dots\dots (6)$$

$$PVA_c = Per_c * \frac{L}{P_{w1} - P_{w2}} \dots\dots\dots (7)$$

donde P<sub>w1</sub> es la presión parcial dentro de la celda de permeabilidad, P<sub>w2</sub> es la presión parcial dentro del desecador, P<sub>w3</sub> y P<sub>w4</sub> son la presión debajo y sobre la película comestible respectivamente, D es la difusividad del vapor de agua a través del aire (2.81956 m<sup>2</sup>/día, 25°C, R es la constante de los gases [0.000462 m<sup>3</sup> kPa/ (g K)], T es la temperatura a la cual se realiza el experimento (298 K), P<sub>T</sub> es la presión

atmosférica (85 kPa en Querétaro) y Permeancia experimental (Permeancia<sub>m</sub>) es la pendiente de la curva de variación de peso contra tiempo (24 horas).

#### 4.2.4.3 Propiedades mecánicas (Dureza y Elasticidad)

El módulo elástico y dureza de las películas se obtuvieron utilizando un nanoidentador (TTX-NHT, CSM, Peseux, Suiza). Esta técnica consiste en aplicar una fuerza para penetrar o deformar la muestra. Esto se llevó a cabo a través del contacto de la punta del equipo con la superficie de la muestra, donde se aplica una fuerza creciente y se registra el desplazamiento que sufre la muestra como resultado de la fuerza aplicada. Los parámetros para determinar la dureza y el módulo de elasticidad se obtienen de las curvas de carga y descarga que proporciona el equipo (Figura 5), a partir de las cuales se obtuvo la carga máxima (P<sub>max</sub>), la penetración total a la carga máxima (h<sub>m</sub>) y la rigidez del contacto al inicio de la descarga (S), así como también el área de contacto (área bajo la curva, A<sub>c</sub>) (Fuentes- Fuentes, 2003).

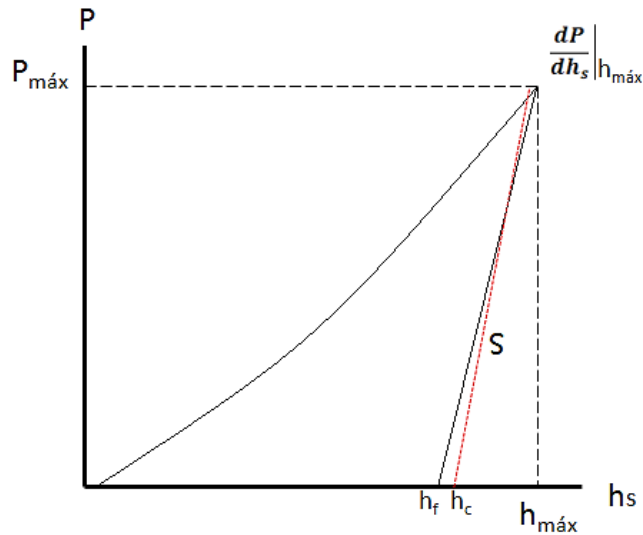


Figura 5. Curva de carga y descarga.  $h_f$ : Profundidad final de la huella,  $S$ : Tangente a la curva de descarga (rigidez),  $h_c$ : Profundidad de contacto logrado en la carga máxima,  $h_s$ : altura por encima de la de contacto con respecto a la superficie de la muestra,  $P_{max}$ : carga máxima.

Para este análisis, la indentación se realizó aplicando una carga máxima de 5 mN, y una velocidad de carga y descarga de 7.5 mN/min y una pausa de 35 s, usando una punta de Berkovich de diamante de geometría piramidal, base triangular y radio punta de 100 nm, obteniendo de esta manera una curva de carga-desplazamiento, a partir de la cual se obtuvieron valores tales como, carga máxima ( $P_{\max}$ ), profundidad de penetración máxima ( $h_{\max}$ ), área de contacto ( $A_c$ ) y rigidez del material ( $h_s$ ). Este análisis se llevó a cabo una vez que las muestras alcanzaron el equilibrio, analizando tres películas de cada una de las formulaciones, realizando tres indentaciones a cada una de las muestras en tres puntos diferentes (centro y extremos). Para calcular la dureza ( $H$ ), se utilizó la ecuación (8) y para el cálculo del módulo elástico las ecuaciones (9) y (10) (Alvarado- González y col., 2010; Escamilla- García y col., 2013).

$$H = \frac{P_{\max}}{A h_c} \dots\dots\dots (8)$$

$$E_r = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A_c}} \dots\dots\dots (9)$$

$$E_m = \frac{1-\nu^2}{\frac{1}{E_r} - \frac{1-\nu^2}{E_i}} \dots\dots\dots (10)$$

Donde:

$E_r$ = Módulo reducido

$E_m$ = Módulo elástico

$\nu$ = Módulo de Poisson, se estima como 0.35 para muestras poliméricas.

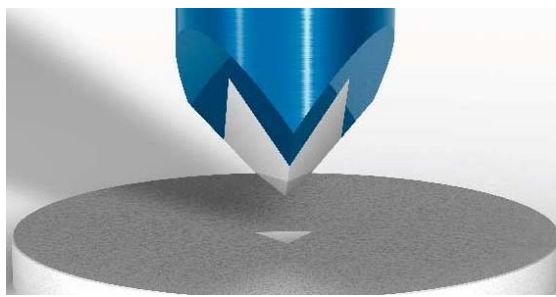


Figura 6. Punta Berkovich de diamante de geometría piramidal.

#### 4.2.4.4 Solubilidad en agua

Para esta prueba se cortaron porciones de película (2 cm x 2 cm) y se colocaron en cajas de petri, se secaron a  $103\pm 2$  °C durante 24 h y se pesaron para determinar el peso seco inicial, una vez transcurrido este tiempo, se colocaron en inmersión en 15 mL de agua destilada durante 6 h y constante en una placa oscilante (UltraRocker 1660709EDU, Bio Rad, E.U.A.), una vez transcurrido este tiempo, se realizó una filtración y se secaron los trozos de película restante ( $103\pm 2$ °C durante 24h) para determinar el peso seco final. El porcentaje de solubilidad se obtuvo utilizando la Ecuación 11 (Ghasemlou y col., 2011).

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final}}{\text{Peso seco inicial}} \times 100 \dots\dots\dots (11)$$

#### 4.2.4.5 Rugosidad

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es una herramienta útil para el estudio de alimentos, permite producir un perfil en 3D de la superficie de la muestra mediante los cambios en la fuerza entre una sonda afilada y la superficie de la muestra, la magnitud de la interacción entre la sonda y la superficie dependerá de la rugosidad de la superficie, además de generar imágenes topográficas de la superficie, también es posible mapear diversas características del material tales como la carga, estructura químicas o biológicas, propiedades magnéticas, comportamiento mecánico o de fricción (Morris, 2012).

Los valores de rugosidad se obtuvieron calculando la raíz cuadrada de la sumatoria del cuadrado de la diferencia de altura para cada lectura respecto al valor promedio, dividido por el número de mediciones en la superficie de las películas comestibles ( $R_q$ ) (Ecuación 12). Además puede obtenerse la media aritmética de los valores absolutos de las diferencias de altura respecto a la altura promedio de la superficie, medida desde el plano ( $R_a$ ) (Ecuación 13) utilizando el programa Nano Scope Analysis 1.2 (Veeco, EUA), para esta determinación se utilizó un microscopio de fuerza atómica (diMultimode V, Veeco), aplicando el método de

contacto y utilizando puntas de silicio (cantiléver RTESP Bruker, Alemania) con una frecuencia de resonancia de 286-362 kHz, una constante de resorte de 20-80 N m<sup>-1</sup> y una velocidad de escaneo de 1 Hz con una resolución de 256 x 256 píxeles.

$$Rq = \sqrt{\frac{\sum Zi^2}{N}} \dots\dots\dots (12)$$

$$Ra = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N Z_j \dots\dots\dots (13)$$

Donde Ra y Rq son los valores de rugosidad (nm), Zi es la diferencia de la altura i respecto al promedio de las alturas, y N es el número de puntos en la imagen.

#### 4.2.4.6 Color

El color fue evaluado a través de los parámetros L\* (luminosidad), ± a\* (del componente rojo al verde) y ± b\* (del componente amarillo a azul) usando un colorímetro Minolta CR400 (Konica Minolta Sensing, Osaka Japón), una fuente de iluminación D65 y un ángulo de 10°. El color fue medido de acuerdo al método ASTM D-1925, estandarizado con una placa blanca. Las diferencias de color fueron calculadas usando la ecuación (14).

$$\Delta E = [ (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2 ]^{1/2} \quad \text{Eq. (14)}$$

Donde ΔE es la diferencia de color, ΔL es la diferencia de luminosidad, Δa es la diferencia de cromaticidad rojo-verde y Δb la diferencia de cromaticidad amarillo-azul (Gutiérrez y col., 2015), utilizando el estándar o blanco (L\*=90.9), a\*=0.021, b\*=-0.0376). Las mediciones se realizaron 4 veces para cada tipo de película.

### 4.2.5 Caracterización química

#### 4.2.5.1 Espectroscopia Raman

Espectroscopia Raman es una técnica que utiliza luz dispersada resultante de las colisiones de fotones de moléculas para investigar las propiedades moleculares, cuando un haz de luz monocromático incide sobre sistemas transparentes, la

mayor parte de ella se transmite sin cambios; sin embargo, una porción muy pequeña de la luz incidente se dispersa. Aunque la mayor parte de la luz dispersada tiene la misma longitud de onda que la radiación incidente, una pequeña parte de ella lo hace en diferentes longitudes de onda, fenómeno denominado dispersión Raman (Van Duyne y col., 2014).

Ésta técnica de espectroscopia vibracional es utilizada para el estudio de materiales complejos, los modos de vibración observados sirven como una huella dactilar de las unidades moleculares en el material lo cual proporciona información acerca de la composición, estructura, grado de ramificación, conformación información acerca de interacciones, información sobre productos químicos, y reacciones, entre otras (Jacobsson y Johansson, 2009).

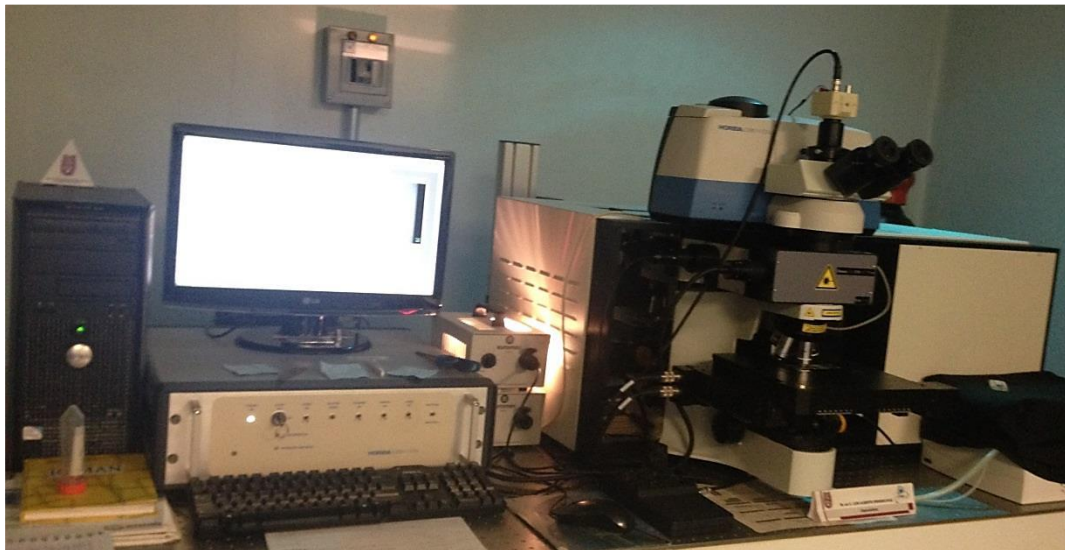


Figura 7. Espectroscopia Raman acoplado a un microscopio.

La interacción química del quitosano con las tres variedades de almidón se analizó mediante un espectroscopia Raman (Raman Olympus BX41 Horiba Yvon, NJ, EUA) acoplado a un microscopio (Olympus BX 41). Las muestras fueron radiadas utilizando un láser de 735 nm con un objetivo de 50x, una amplitud numérica de 0.55 y un límite de difracción de 702 nm. Se utilizó una resolución espectral de 0.16  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando un detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) con un rango

espectral de 450 a 950 nm. La apertura confocal y la rendija de entrada del monocromador se mantuvieron constantes a 400  $\mu\text{m}$ . Las lecturas se realizaron en un intervalo espectral de 200 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Escamilla y col., 2013).

Para el tratamiento de los datos se utilizó el programa Spekwin 32 (<http://www.effemm2.de/spekwin>).

### 4.3 Análisis estadístico



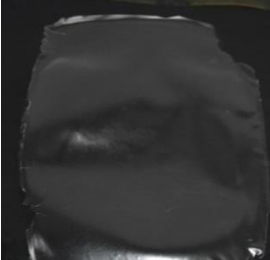
Los datos fueron evaluados por el análisis de la varianza (ANOVA), y los resultados significativos fueron analizados mediante la prueba de Tuckey ( $P < 0.05$ ) para probar las diferencias significativas entre los promedios obtenidos para cada una de las películas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterización física

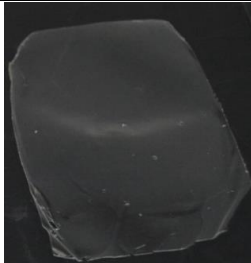



En el Cuadro 1 se presenta la descripción de las películas comestibles de los componentes individuales y sus respectivas mezclas, como se puede apreciar, la adición del quitosano en el almidón permite obtener películas menos opacas y con mejor textura.

Cuadro 1. Características generales de las películas comestibles obtenidas.

<b>Película comestible</b>	<b>Características</b>	<b>Película</b>
<b>Q</b>	Transparente, ligeramente amarilla y flexible	 Figura 8. Película de quitosano.
<b>AO</b>	Transparente, firme y poco quebradiza	 Figura 9. Película de almidón oxidado.
<b>AA</b>	Opaca, firme y poco quebradiza	 Figura 10. Película de almidón acetilado.



Cuadro 1. Características generales de las películas comestibles obtenidas.  
Continuación.

Película comestible	Características	Película
AC	Transparente y quebradiza	 <p data-bbox="959 722 1398 793">Figura 11. Película de almidón ceroso.</p>
Q-AO	Transparente, ligeramente amarilla, flexible y resistente	 <p data-bbox="943 1079 1414 1150">Figura 12. Película de quitosano-almidón oxidado.</p>
Q-AC	Transparente, ligeramente amarilla, flexible y resistente	 <p data-bbox="943 1436 1414 1507">Figura 13. Película de quitosano-almidón ceroso.</p>
Q-AA	Transparente, ligeramente amarilla, flexible y resistente	 <p data-bbox="938 1764 1409 1835">Figura 14. Película de quitosano-almidón acetilado.</p>

\*Q: Quitosano, AA: Almidón acetilado, AC: Almidón ceroso, AO: Almidón oxidado

## 5.2 Espesor y contenido de humedad

El espesor y contenido de humedad de las películas comestibles se muestran en el Cuadro 2. Se presentó una diferencia significativa entre los valores obtenidos del espesor de las películas de almidón y de las películas a base de la mezcla de quitosano con los diferentes almidones. Se observó una disminución del espesor de las películas de almidón con la adición del quitosano en la formulación. La película de AA presentó el mayor espesor ( $128 \pm 14$ ) y la película de quitosano presentó el menor espesor ( $66 \pm 6 \mu\text{m}$ ). No se presentaron diferencias significativas en el espesor de las películas de las mezclas quitosano-almidón.

Cuadro 2. Espesor y % de Humedad de películas comestibles.

<b>Película comestible</b>	<b>Espesor (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Humedad (% p/p)</b>
<b>Q</b>	$66 \pm 6^{\text{d}}$	$15.56 \pm 0.72^{\text{b}}$
<b>AO</b>	$105 \pm 26^{\text{b}}$	$11.34 \pm 0.22^{\text{cd}}$
<b>AA</b>	$128 \pm 14^{\text{a}}$	$10.38 \pm 0.53^{\text{d}}$
<b>AC</b>	$112 \pm 11^{\text{ab}}$	$9.93 \pm 0.60^{\text{d}}$
<b>Q-AO</b>	$74 \pm 7^{\text{cd}}$	$11.53 \pm 0.85^{\text{cd}}$
<b>Q-AA</b>	$93 \pm 13^{\text{bc}}$	$17.98 \pm 1.64^{\text{a}}$
<b>Q-AC</b>	$81 \pm 5^{\text{cd}}$	$13.48 \pm 0.78^{\text{bc}}$

\*Q: Quitosano, AO: Almidón oxidado, AA: Almidón acetilado, AC: Almidón ceroso. Letras en superíndice indican valores significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

En el Cuadro 2 se muestran los porcentajes de humedad de las películas comestibles. La película de Q-AA presentó el mayor porcentaje de humedad ( $17.98 \pm 1.64$ ) y ésta fue estadísticamente diferente a las películas de las mezclas Q-AO y Q-AC. Por otro lado, la película de AC presentó menor porcentaje de humedad ( $9.93 \pm 0.60$ ) y este aumenta en su mezcla con quitosano ( $13.48 \pm 0.78$ ). No se presentaron diferencias significativas en las humedades de las películas de Q-AO y Q-AC. Se observó que la incorporación del quitosano tiene un efecto significativo en las películas de almidón provocando un aumento en la humedad.

## 5.1 Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es una de las propiedades más importantes a evaluar de las películas comestibles, los valores de PVA de las películas estudiadas se presentan en el Cuadro 3 donde se puede apreciar que la película elaborada a base de almidón acetilado presentó el valor más alto [ $2.06 \pm 0.61 \times 10^{-9}$  g/(s mPa)], la PVA de las películas de Q-AO, Q-AA, Q-AC, AC y Q no muestran diferencias significativas, para el caso de la película de quitosano, se puede apreciar que la adición del almidón en su formulación mejora su propiedad de barrera para los tres casos, se observa la disminución de la PVA al ser incorporado el quitosano en la película de almidón acetilado QAA [ $1.111 \pm 0.031 \times 10^{-9}$  g/(s mPa)], caso contrario en las películas de QAC y QAO que aunque no se presentan diferencias significativas con la PVA de almidones individuales (AC y AO), hay un ligero aumento en la PVA al adicionar quitosano a la película de almidón.

Cuadro 3. Permeabilidad y porcentaje de solubilidad películas comestibles.

<b>Película comestible</b>	<b>Permeabilidad al vapor de agua x 10<sup>9</sup>(g /smPa)</b>	<b>Solubilidad (%)</b>
<b>Q</b>	$1.65 \pm 0.47^{ab}$	$17.07 \pm 1.38^d$
<b>AO</b>	$1.00 \pm 0.39^b$	$80.06 \pm 2.37^a$
<b>AA</b>	$2.06 \pm 0.61^a$	$39.57 \pm 1.68^b$
<b>AC</b>	$1.15 \pm 0.33^{ab}$	$40.97 \pm 3.41^b$
<b>Q-AO</b>	$1.18 \pm 0.48^{ab}$	$26.77 \pm 1.40^c$
<b>Q-AA</b>	$1.11 \pm 0.031^{ab}$	$32.02 \pm 2.23^c$
<b>Q-AC</b>	$1.32 \pm 0.54^a$	$27.71 \pm 1.56^c$

\*Q: Quitosano, AA: Almidón acetilado, AC: Almidón ceroso, AO: almidón oxidado. Letras en superíndice indican valores significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

El Cuadro 3 también muestra los valores de % de solubilidad de las películas, en el cual se puede apreciar que la adición de quitosano en las películas de almidón permite disminuir significativamente la solubilidad de las mismas, efecto que fue

más notable en la película de AO donde se disminuye notablemente la solubilidad de  $80.06 \pm 2.37$  a  $80.06 \pm 2.37$  %. No se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de solubilidad de las películas Q-AO, Q-AA y Q-AC.

En la Figura 15, se muestra una gráfica comparativa de PVA de quitosano, los tres almidones individuales y sus respectivas mezclas, donde se puede observar que la adición de quitosano a la película de AA mejora significativamente la propiedad de barrera, mientras que en el caso de las películas de quitosano con AO y AC no se ve afectada significativamente su PVA al adicionar quitosano.

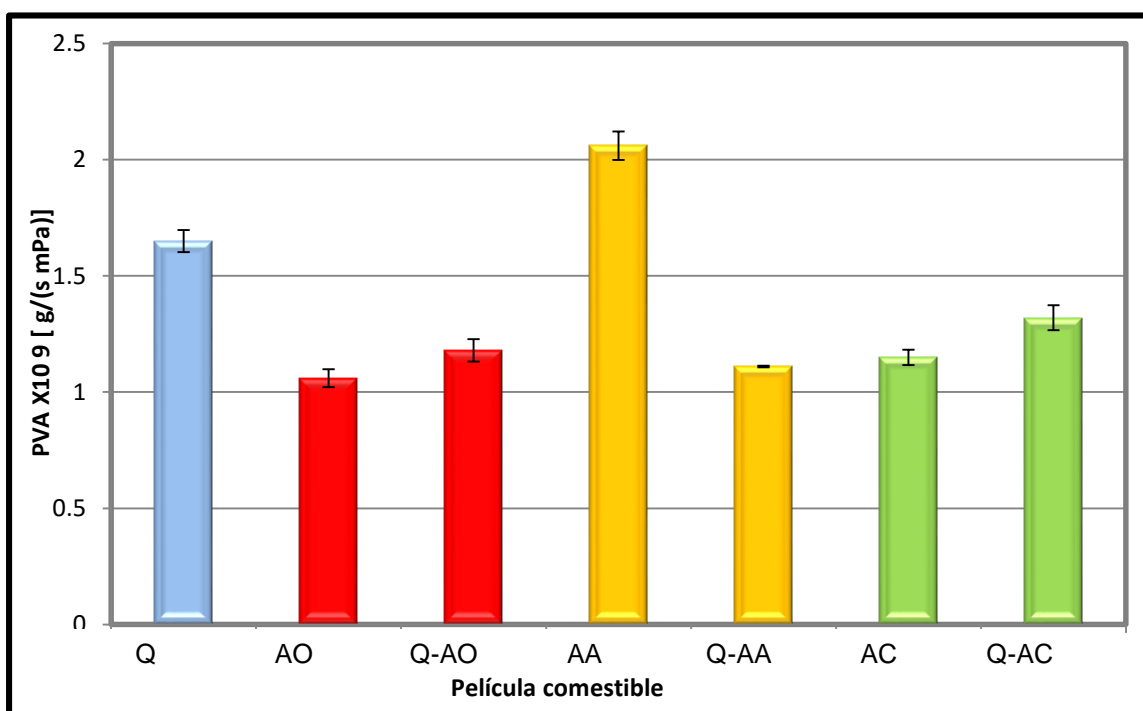


Figura 15. Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles.

## 5.2 Propiedades mecánicas (Dureza y Elasticidad)

En el Cuadro 4 se muestran los valores de dureza y módulo elástico. Se presentó un efecto significativo en las películas de los diferentes tipos de almidón al adicionar quitosano, provocando una notable disminución de su dureza. La dureza de la película de quitosano no fue estadísticamente diferente a la dureza de las películas de las mezclas con los diferentes tipos de almidón, aunque la película de

QAO presentó el menor valor de dureza ( $2.30 \pm 0.19$  MPa) de las mezclas. Por otro lado, la película de AA presentó el valor más alto de dureza  $198.77 \pm 22.55$ .

Se observó un efecto significativo en la película de AC al adicionar quitosano, provocando un aumento en su módulo elástico y por lo tanto volviéndola menos elástica; sin embargo, la elasticidad de las películas de AO Y AA no se ve afectada con la incorporación del quitosano en su formulación.

La película de Q presentó el menor valor de módulo elástico ( $0.07 \pm 0.01$  GPa) es decir, fue la más elástica. La película de AA fue la menos elástica al presentar el valor más alto de módulo elástico ( $4.31 \pm 0.35$  GPa). Se observó que la adición de quitosano a la formulación de las películas de almidón tiene un efecto significativo sobre su módulo elástico y dureza haciéndolas más elásticas y flexibles.

Cuadro 4. Dureza y módulo elástico de las películas comestibles.

<b>Película comestible</b>	<b>Dureza (MPa)</b>	<b>Módulo elástico (GPa)</b>
<b>Q</b>	$5.87 \pm 0.46^c$	$0.07 \pm 0.01^e$
<b>AO</b>	$168.90 \pm 3.00^b$	$2.76 \pm 0.15^c$
<b>AA</b>	$198.77 \pm 22.55^a$	$4.31 \pm 0.35^a$
<b>AC</b>	$180.99 \pm 4.31^b$	$3.36 \pm 0.12^b$
<b>Q-AO</b>	$2.30 \pm 0.19^c$	$0.11 \pm 0.06^e$
<b>Q-AA</b>	$3.97 \pm 0.73^c$	$0.09 \pm 0.01^e$
<b>Q-AC</b>	$9.54 \pm 1.42^c$	$0.44 \pm 0.03^d$

\*Q: Quitosano, AA: Almidón acetilado, AW: Almidón waxy, AO: Almidón oxidado, Letras en superíndice indican valores significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

### 5.3 Rugosidad

En el Cuadro 5 se muestran los valores de rugosidad (Ra y Rq) de las películas. Se observa que la película de quitosano presentó el valor más bajo de rugosidad ( $Ra=2.06 \pm 0.23$  y  $Rq= 2.653 \pm 0.35$ ) sin embargo no presenta diferencia significativa con las películas de AO, Q-AO y Q-AC en su valor de Ra. La película de AA presentó el valor más alto de Ra y Rq, por lo que fue la más rugosa ( $Ra= 7.48 \pm 0.77$  y  $Rq= 9.635 \pm 0.48$ ), pero al incorporar el quitosano en esta película la

rugosidad disminuyó ( $Ra= 3.972 \pm 0.334$  y  $Rq= 5.446 \pm 0.245$ ), el mismo efecto se presentó en las demás películas de almidón. La adición de quitosano en las películas de almidón tiene un efecto significativo en la rugosidad, provocando su disminución.

Cuadro 5. Rugosidad de las películas comestibles.

Película comestible	Ra (nm)	Rq (nm)
Q	$2.06 \pm 0.23^d$	$2.65 \pm 0.35^e$
AO	$2.59 \pm 0.55^{cd}$	$3.47 \pm 0.62^d$
AA	$7.48 \pm 0.78^a$	$9.64 \pm 0.48^a$
AC	$2.82 \pm 0.52^c$	$4.46 \pm 0.38^c$
Q-AO	$2.26 \pm 0.53^{cd}$	$3.20 \pm 0.41^{de}$
Q-AA	$3.972 \pm 0.33^b$	$5.45 \pm 0.25^b$
Q-AC	$2.71 \pm 0.87^{cd}$	$4.14 \pm 0.54^c$

\*Q: Quitosano, AA: Almidón acetilado, AC: Almidón ceroso, AO: almidón oxidado. Letras en superíndice indican valores significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

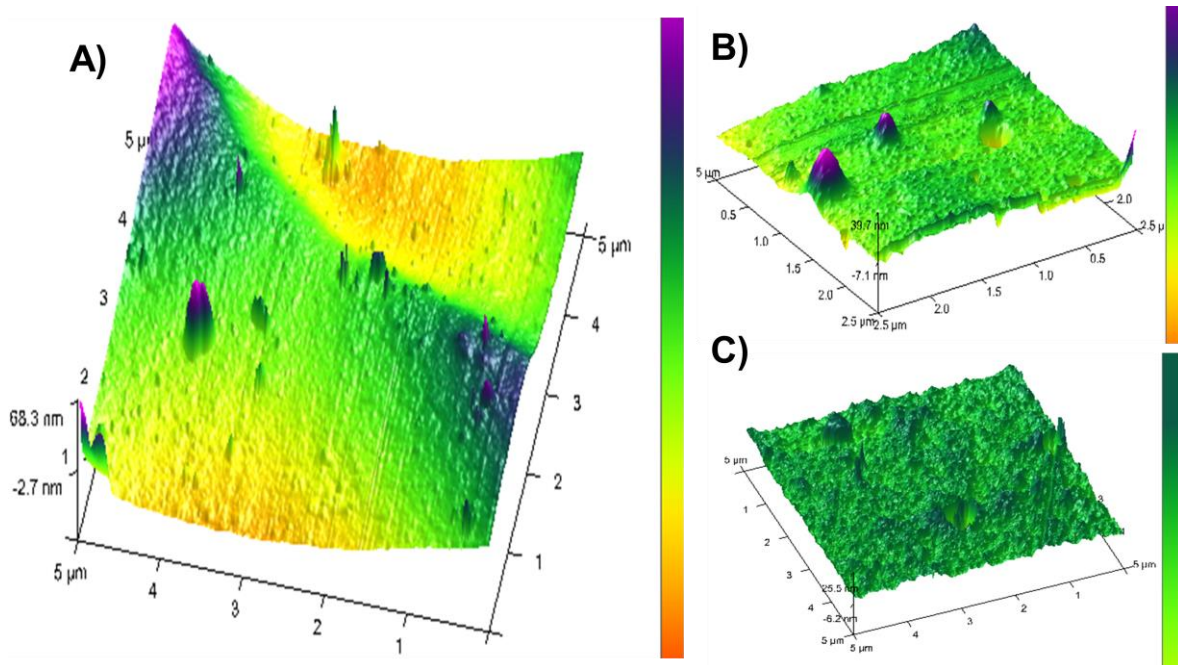


Figura 16. Micrografía de películas comestibles (5 x 5  $\mu\text{m}$ ): A) Mezcla Quitosano-Almidón ceroso. B) Almidón ceroso. C) Quitosano.

En la Figura 16 se observan las micrografías en un área de  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ , de las películas de Q, AC y la mezcla de estos, en cada una de ellas se presenta una escala de color que va del color anaranjado (representa la profundidad) a morado (representa la altura), esto quiere decir que entre mayor gama de colores se presente en la micrografía menor uniformidad tiene la superficie de la muestra. La película de quitosano (Figura 16C) presenta la superficie más lisa en comparación a la de AC (Figura 16B) y la mezcla Q-AO (Figura 16A), esto se puede apreciar en el color que presenta la superficie del quitosano al ser totalmente verde, mientras que las películas de AC y la mezcla Q-AC presentan superficies más rugosas lo cual coincide con lo presentado en el Cuadro 5 donde la película de quitosano presenta el valores más bajos de rugosidad ( $R_a = 2.06 \pm 0.23\ \text{nm}$  y  $R_q = 2.65 \pm 0.35\ \text{nm}$ ) en comparación a la película elaborada a base de AC ( $R_a = 2.82 \pm 0.52\ \text{nm}$  y  $R_q = 4.46 \pm 0.38\ \text{nm}$ ) y la mezcla Q-AC ( $R_a = 2.71 \pm 0.87\ \text{nm}$  y  $R_q = 4.14 \pm 0.54\ \text{nm}$ ).

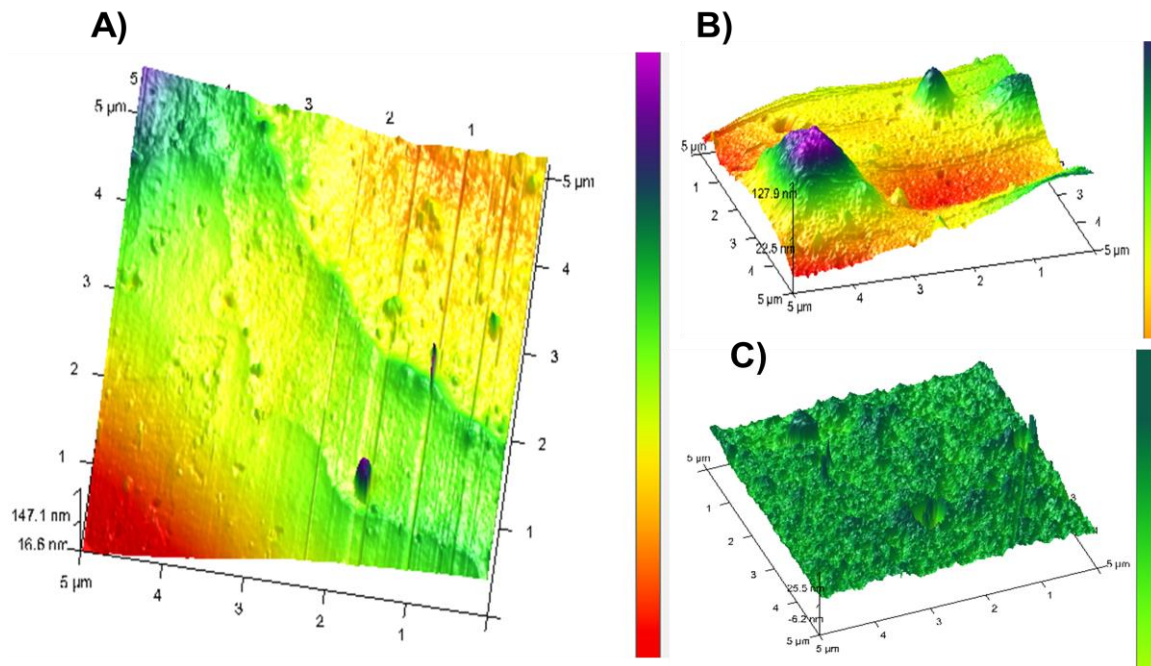


Figura 17. Micrografía de películas comestibles ( $5 \times 5\ \mu\text{m}$ ): A) Mezcla Quitosano-Almidón oxidado. B) Almidón oxidado. C) Quitosano.

En la Figura 17 se observan las micrografías de las películas de Q, AO y la mezcla de estos, al igual que en el caso anterior la película de Q (Figura 17C) presenta la



superficie más homogénea y lisa; sin embargo, de acuerdo a los datos presentados en el Cuadro 5 la película elaborada a base de la mezcla Q-AO (Figura 17A) no presenta diferencia significativa con respecto a las películas elaboradas usando Q y AO, aunque la rugosidad disminuye al incorporar Q en la película de AO.

La topografía de la película elaborada a base de la mezcla Q-AA se muestra en la Figura 18A, de la cual se puede apreciar una superficie lisa, aunque más rugosa que la elaborada a base de quitosano solo, en esta figura se observa que la adición de Q proporciona una superficie más lisa al almidón en comparación con la solamente elaborada con AA (Figura 18B); esto concuerda con lo presentado en el Cuadro 5, en donde la película de AA presenta los valores de rugosidad más altos ( $7.48 \pm 0.78$  nm).

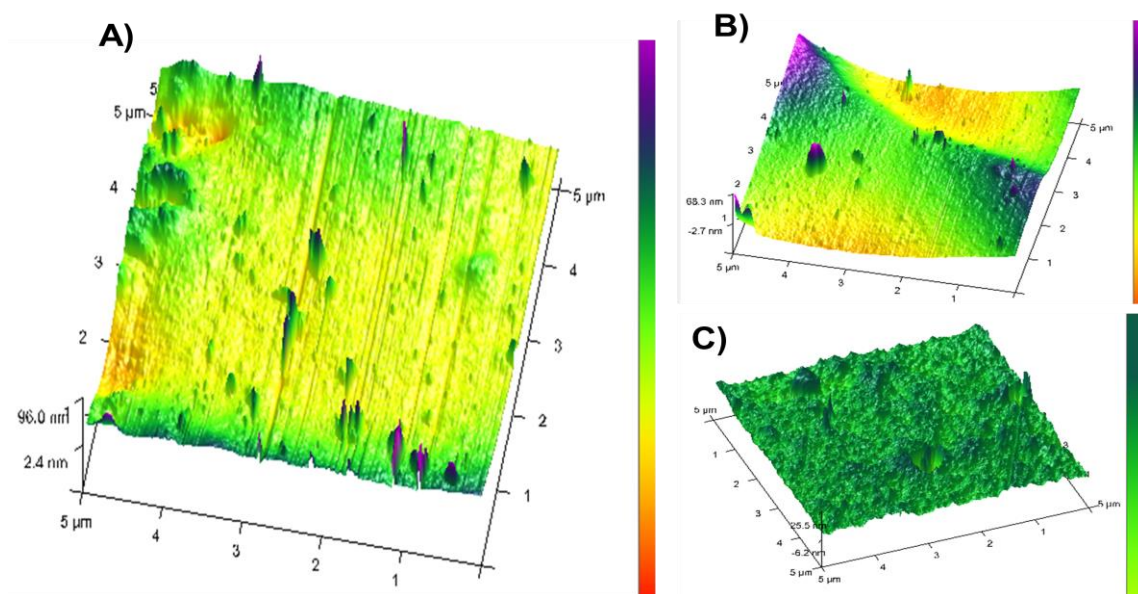


Figura 18. Micrografía de películas comestibles (5 x 5  $\mu\text{m}$ ): A) Mezcla Quitosano-Almidón acetilado. B) Almidón acetilado. C) Quitosano.

#### 5.4 Color

En el Cuadro 6 se presentan los parámetros de color  $a^*$  (valor cromático de rojo a verde),  $b^*$  (valor cromático de amarillo a azul),  $L^*$  (Luminosidad) y  $\Delta E$  (diferencia de color total) obtenidos de las películas comestibles. De los valores presentados se puede observar que las películas elaboradas a base de la mezcla de almidón con



quitosano, presentan una mayor coloración amarilla, siendo la del valor más alto de  $b^*$  la película elaborada a base de la mezcla Q-AO, aunque esta no presenta diferencias significativas con la película de Q-AA, mientras que las películas de almidón individual presentan los valores más bajos de  $b^*$  sin presentar diferencias significativas. Dentro del parámetro de luminosidad solamente la película de AC y QAO fueron significativamente diferentes; se observa la disminución de la luminosidad al adicionar Q al AO ( $L^*=88.87 \pm 0.32$ ) y al AC ( $L^*=90.26 \pm 0.73$ ). Aunque las demás películas de almidón y su mezcla con quitosano no presentaron diferencias significativas, la película de Q-AA presentó el mayor valor de luminosidad y la de Q-AO el menor valor. El valor cromático  $a^*$  de todas las películas presenta valores negativos que, aunque son muy pequeños tienden al color verde. Las películas de AO, AA y AC presentaron el mayor valor de  $a^*$  y no fueron significativamente diferentes, por otro lado, la película de Q-AO presentó el valor más bajo de  $a^*$ . Dentro de las películas de la mezcla quitosano-almidón, solamente la de Q-AA y Q-AC presentaron diferencias significativas. No se obtuvieron diferencias significativas en la diferencia total del color de las películas ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 6. Parámetros de color (valor cromático de  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ ) de las películas comestibles

<b>Película comestible</b>	<b><math>L^*</math></b>	<b><math>a^*</math></b>	<b><math>b^*</math></b>	<b><math>\Delta E^*</math></b>
<b>Q</b>	$91.37 \pm 0.15^{ab}$	$-1.15 \pm 0.34^b$	$4.38 \pm 0.14^b$	$4.58 \pm 0.17^{bc}$
<b>AO</b>	$91.06 \pm 2.78^{ab}$	$-0.24 \pm 0.61^a$	$0.92 \pm 0.21^c$	$2.39 \pm 2.78^{cd}$
<b>AA</b>	$90.42 \pm 2.22^{ab}$	$-0.24 \pm 0.48^a$	$0.43 \pm 0.11^c$	$1.64 \pm 2.22^d$
<b>AC</b>	$93.06 \pm 2.02^a$	$-0.23 \pm 0.37^a$	$0.47 \pm 0.27^c$	$2.51 \pm 2.38^{cd}$
<b>Q-AO</b>	$88.87 \pm 0.32^b$	$-1.64 \pm 0.41^c$	$7.13 \pm 1.69^a$	$7.70 \pm 0.46^a$
<b>Q-AA</b>	$91.14 \pm 0.08^{ab}$	$-1.37 \pm 0.24^{bc}$	$6.70 \pm 0.85^a$	$6.66 \pm 0.13^{ab}$
<b>Q-AC</b>	$90.26 \pm 0.73^{ab}$	$-1.32 \pm 0.54^b$	$4.83 \pm 0.83^b$	$5.55 \pm 0.68^{ab}$

Q: Quitosano, AO: Almidón oxidado, AA: Almidón acetilado, AC: Almidón ceroso. Letras en superíndice indican valores significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

## 5.5 Caracterización química

### 5.5.1 Espectroscopia Raman

Para conocer las interacciones de los componentes de las películas comestibles (quitosano y los tres tipos de almidón) se utilizó espectroscopia Raman para observar la aparición o desaparición de bandas en el espectro. Se analizaron las películas de quitosano, los tres tipos de almidón y sus mezclas a un rango de 200 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ .

En la Figura 17 se muestran los espectros Raman de las películas de AA, Q, y Q-AA, en donde se observa la desaparición de la señal de Q a 542.35  $\text{cm}^{-1}$ , 653.56  $\text{cm}^{-1}$  y 890  $\text{cm}^{-1}$  al realizar la mezcla Q-AA; un fenómeno similar se presenta para el caso del espectro del AA que presenta señal en 1202  $\text{cm}^{-1}$  pero en el espectro de la mezcla no se presenta. El espectro obtenido de la mezcla Q-AA presenta una señal que en los compuestos sin mezclar no aparece (1695  $\text{cm}^{-1}$ ), estos cambios en las señales indican una posible interacción entre los componentes de las películas comestibles.

En la Figura 19 se aprecia el espectro de la mezcla de Q, AO y Q-AO, en el cual se presentan interacciones químicas entre los componentes; donde al igual que en el espectro anterior (Figura 17) la señal característica del quitosano en 542.35  $\text{cm}^{-1}$  desaparece al realizar la mezcla. Sin embargo, a diferencia de la película de la mezcla Q-AA además de desaparecer la señal característica del almidón en 890  $\text{cm}^{-1}$ , también desaparecen las señales en 778  $\text{cm}^{-1}$  y 820  $\text{cm}^{-1}$  al realizar la mezcla con quitosano y se presentan señales diferentes para el AO y Q en la mezcla a Q-AO a 613  $\text{cm}^{-1}$  y 1730  $\text{cm}^{-1}$ .

Para el caso del AC, Q y sus mezclas (Figura 19) se observa la desaparición de las señales a 421  $\text{cm}^{-1}$  (característica del almidón), 542  $\text{cm}^{-1}$ , 924  $\text{cm}^{-1}$  y 1409  $\text{cm}^{-1}$  (características del quitosano), 613  $\text{cm}^{-1}$  y 1220  $\text{cm}^{-1}$  (presentes en los espectros de A y Q sin mezclar) en el espectro de la mezcla Q-A, así como la presencia de una señal diferente a los espectros del resto de las películas a 1737  $\text{cm}^{-1}$ .

Para una mejor visualización, en la Figura 20 se encuentran los espectros obtenidos de las tres mezclas elaboradas (Q-AA, Q-AO y Q-AC) en donde la mezcla Q-AC no presenta señal a  $756\text{ cm}^{-1}$  a diferencia de las películas de Q-AA y Q-AO que si la presentan. De igual forma se observa que el espectro de la película de Q-AA no presenta señales a  $533\text{ cm}^{-1}$  y  $1398\text{ cm}^{-1}$  y los espectros de las películas de Q-AC y QAO si las presentan, por lo que el proceso de modificación que se utilice en el almidón afecta el tipo de interacción entre los componentes de las películas.

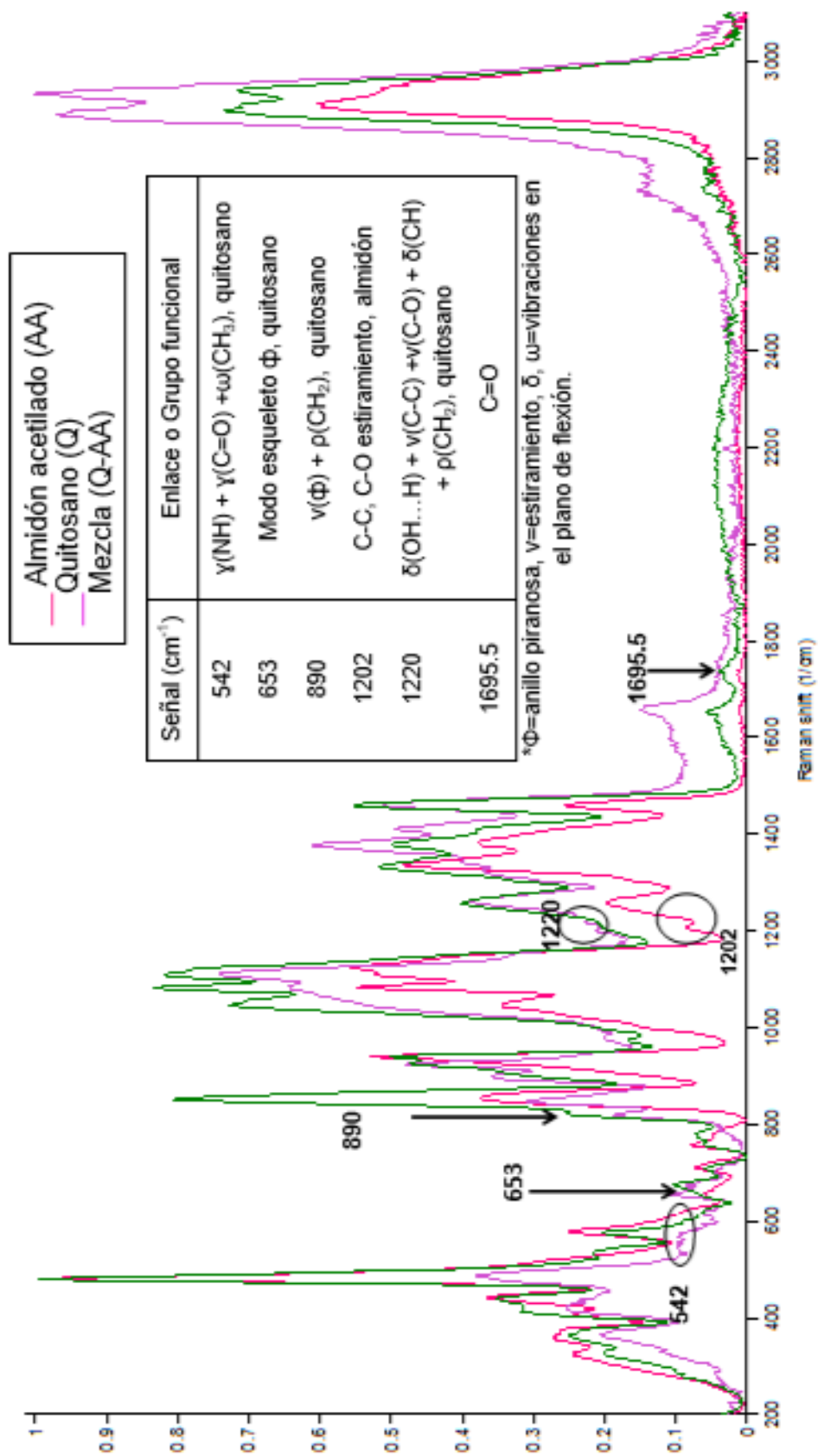


Figura 19. Espectroscopia RAMAN de mezcla Quitosano- Almidón acetilado y sus componentes individuales

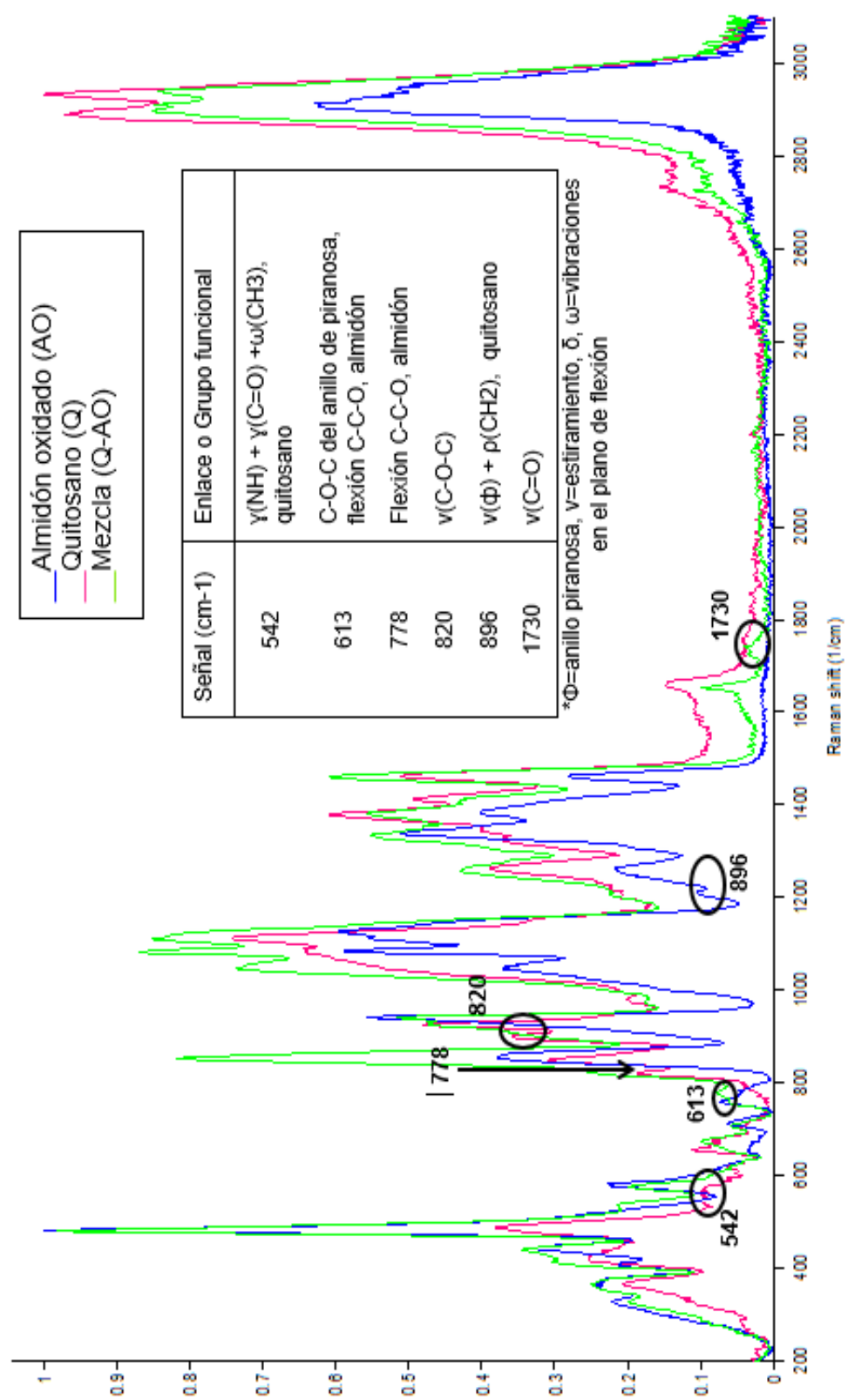


Figura 20. Espectroscopia RAMAN de mezcla Quitosano- Almidón oxidado y sus componentes individuales

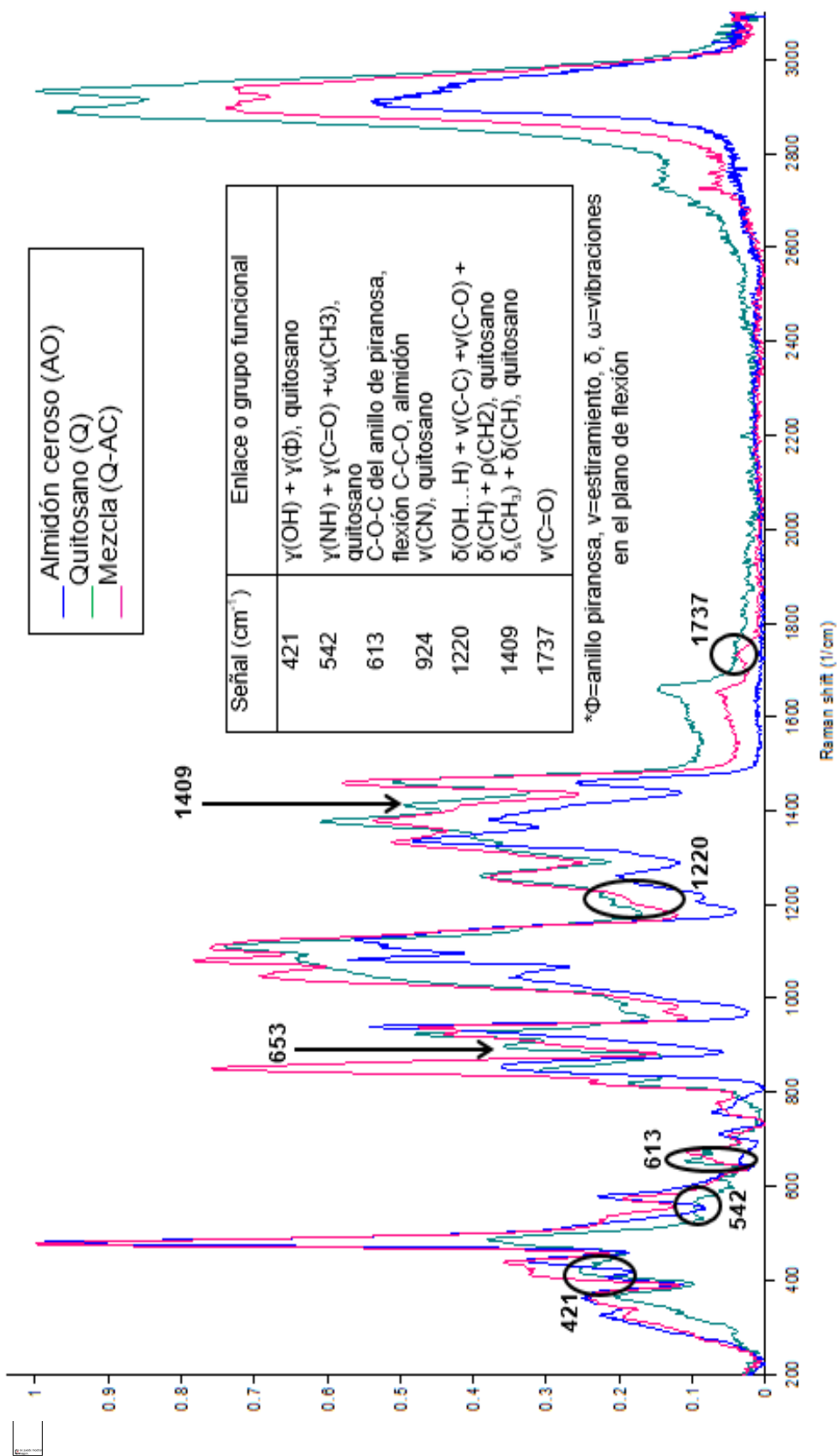


Figura 21. Espectroscopia RAMAN de mezcla Quitosano- Almidón ceroso y sus componentes individuales

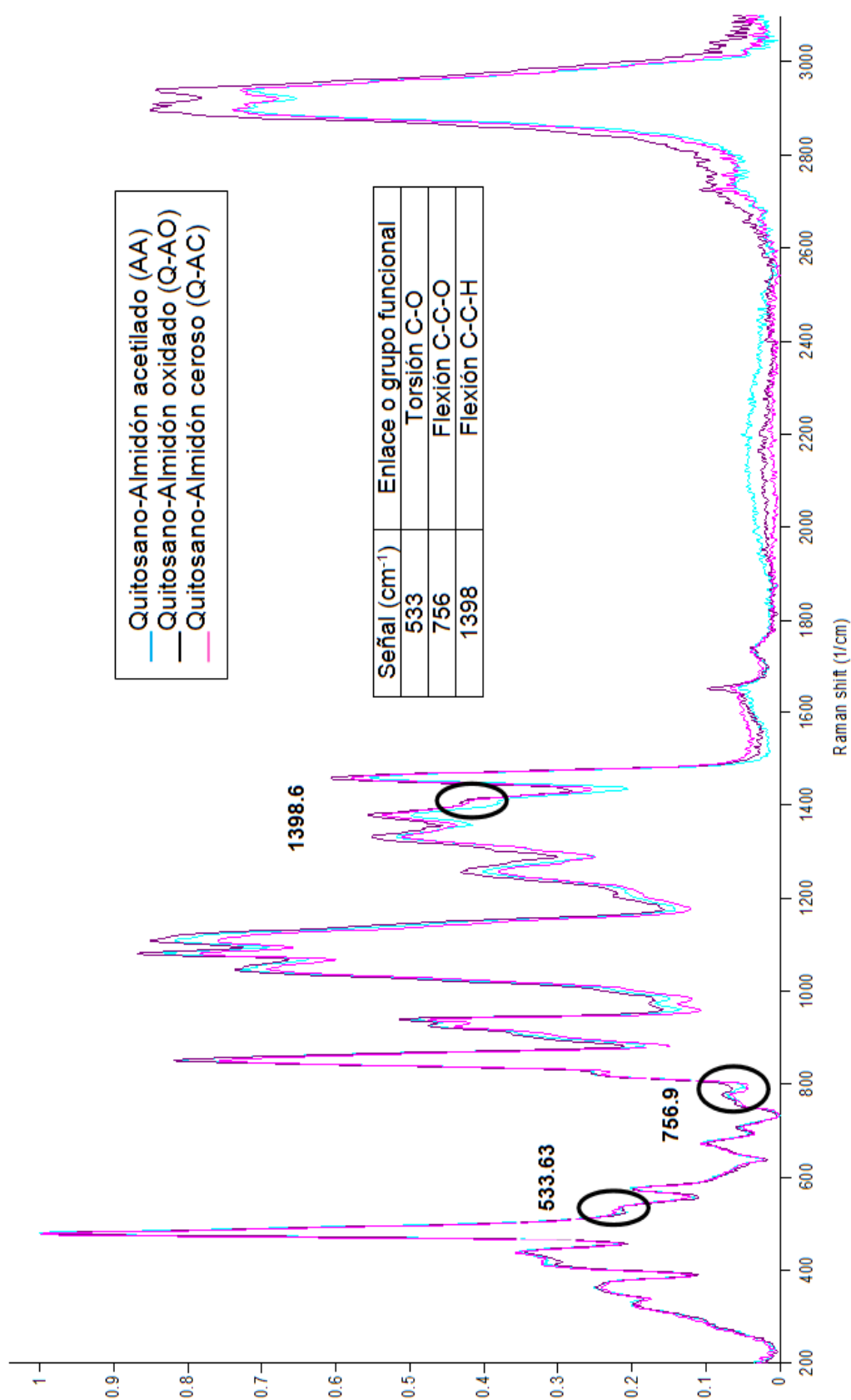


Figura 22. Espectroscopia RAMAN de las mezclas quitosano con los tres tipos de almidón modificado.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Caracterización física

#### 6.1.1 Espesor y Contenido de humedad

Algunos estudios han reportado que el espesor y el contenido de humedad de las películas comestibles afectan las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las mismas (Gutiérrez y col., 2015). Las películas comestibles elaboradas a base de almidón presentan valores de espesor más alto que las películas que tienen en su composición quitosano, siendo la de mayor espesor la elaborada con AA ( $112 \pm 11 \mu\text{m}$ ). De los resultados obtenidos se observa que las películas de AA y AO presentan espesores con diferencia significativa, esto se debe al tipo de modificación a la que se somete el almidón (oxidación o acetilación) ya que ésta afecta su composición (amilosa/amilopectina/ grupos oxidantes o acetilados) y por lo tanto sus propiedades funcionales tales como el grado de hinchamiento de los gránulos y viscosidad, lo cual se va a reflejar en el espesor de las películas. Rincón y col., (2007) reportaron que a mayor porcentaje de amilopectina se presentan mayores espesores de las películas. Las de AA y AC presentan los valores de espesor mayor  $128 \pm 14$  y  $112 \pm 11 \mu\text{m}$ ), el almidón ceroso al presentar una composición alta en amilopectina (cerca del 93% p/p) genera un alto hinchamiento del gránulo y origina un mayor espesor (Lu y col., 2014).

En el Cuadro 2 se enlistaron los valores de % de humedad, y al igual que con el espesor, el hinchamiento del gránulo de almidón afecta la humedad de las películas comestibles. Para el caso de las películas de almidón este se relaciona con la capacidad de absorción de agua; las películas de almidón modificado (AA y AO) presentan una mayor humedad que la del AC. Se ha reportado que la presencia de los grupos acetilo del AA permite absorber una mayor cantidad de agua en comparación al y facilitando a su vez el acceso de agua a la región amorfa del almidón; de igual forma el contenido de grupos carbonilo y carboxilo en



el almidón oxidado presenta mayor afinidad por el agua provocando por lo tanto el hinchamiento del gránulo de almidón (Rincón y col., 2007).

La adición de Q a las películas de almidón provocó un aumento en el porcentaje de humedad, esto se explica por la naturaleza hidrofílica del quitosano en la que los grupos hidroxilo expuestos del mismo interactúan fácilmente con el agua (Antoniou y col., 2016; Ho y col., 2016), lo que provoca mayor contenido de humedad en las películas, indicando que entre mayor sea el contenido de grupos hidroxilo disponibles del quitosano mayor será el contenido de humedad de la película. La película de Q-AA tiene el % de humedad más alto en comparación al resto de las mezclas, lo cual se atribuye a las interacciones del quitosano con cada tipo de almidón. En el caso del AA los grupos acetilo que sustituyen los grupos hidroxilo del almidón nativo aumentan su capacidad de interacción con el agua, mientras que los grupos hidroxilo del almidón presentan menor capacidad de retención de agua (Amit y col., 2010), es por ello que la película de Q-AA presentó el mayor contenido de humedad.

### 6.1.3 Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua

La PVA es una propiedad esencial para establecer la eficacia de las películas comestibles, ya que el objetivo de estas es prevenir o reducir la transferencia de humedad del ambiente al alimento y esta dependerá del espesor de la película, la humedad, la concentración y las interacciones existentes entre los componentes de la matriz de la película (Bertuzi y col., 2007; Gutiérrez y col., 2015). La disminución de la PVA de la película de AA es notable al mezclarla con quitosano (Q-AA), pero este efecto no fue el mismo al mezclar el AO y AC con el quitosano (Q-AO y Q-AC); aunque la PVA de las películas de las 3 mezclas no presenta diferencia significativa, por lo cual se concluye que la presencia de Q mejora la propiedad de barrera debido a la interacción del quitosano con cada tipo de almidón. Según Alves y col. (2007), las posibles interacciones del quitosano con el almidón dependen de la relación amilosa/ amilopectina así como de los grupos funcionales que caracterizan a cada uno de los almidones utilizados. La película

de AA presentó las propiedades de barrera más pobres, aun siendo la película de espesor mayor, lo cual se atribuyó a que los grupos acetilo retienen con mayor facilidad el agua, resultando a su vez en mayores valores de PVA. La película de quitosano no presenta diferencia significativa en PVA con respecto a las mezclas Q-A. Los valores de permeabilidad obtenidos son similares a los reportados por Trejo y col. (2001) quienes para películas de quitosano (1%) y sorbitol a diferentes concentraciones (1-4%) obtuvieron valores de PVA en el rango  $1.21 \times 10^{-9}$  –  $1.35 \times 10^{-9}$  [g/(s mPa)].

Para determinar la aplicación de la película el porcentaje de solubilidad es un factor importante a evaluar, la película comestible de AO presenta el mayor porcentaje de solubilidad, esto se debe a los grupos carboxilo presentes en su estructura los cuales facilitan su combinación con el agua, se puede observar que el proceso de oxidación del almidón aumenta significativamente la solubilidad de la película de  $40.97 \pm 3.41$  a  $80.06 \pm 2.37$  %, de acuerdo a lo reportado por Liu y col. (2014) el aumento de la solubilidad se debe a la despolimerización y el debilitamiento estructural de los gránulos de almidón produciendo un aumento en la movilidad de las moléculas y a la introducción de grupos carboxilo los cuales se combinan más fácilmente con el agua. A pesar de que la película elaborada con almidón oxidado presenta la mayor solubilidad, al realizar la mezcla, es la que presenta el valor más bajo en comparación al resto de las mezclas (Q-AO:  $26.77 \pm 1.40$  %; Q-AA:  $32.02 \pm 2.23$  %; Q-AC:  $27.71 \pm 1.56$  %). De acuerdo con Mei y col. (2013) la solubilidad de las películas comestibles depende de la cantidad de enlaces que se forman entre los componentes que la conforman, por lo que el almidón oxidado puede estar formando una mayor cantidad o diferentes tipos de enlace con el quitosano que no se forman al utilizar almidón acetilado o almidón ceroso. Por otro lado, el glicerol es altamente soluble en agua por lo cual no llega a formar enlaces con la estructura de la película y por lo tanto no afecta a la solubilidad de las mismas

La película con el menor valor de solubilidad lo obtuvo la película de quitosano ( $17.07 \pm 1.38$  %), esto puede ser ocasionado por su grado de desacetilación

( $\geq 75\%$ ), ya que algunos estudios reportan que entre mayor sea la cantidad de grupos amino menor será la solubilidad del quitosano en agua (Cheng y col., 2015).

En base a lo mencionado anteriormente, es posible que el almidón acetilado y el almidón ceroso estén interaccionando con los grupos amino del quitosano, haciendo que las películas sean más solubles, mientras que el almidón oxidado interacciona con una mayor cantidad de grupos hidroxilo además de interaccionar con los grupos amino, en comparación a los otros almidones, haciendo la película en base a esta mezcla menos soluble que las demás.

#### 6.1.4 Rugosidad (Ra y Rq)

La topografía de las películas se evaluó utilizando un microscopio de fuerza atómica, del cual se evaluaron dos parámetros de rugosidad Ra (promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas medida a partir de la línea central) (Hinojosa Rivera y Reyes Melo, 2001) y Rq (valor cuadrático medio de las desviaciones) (Mata- Cabrera y col., 2013). La película que presentó el valor más bajo de rugosidad fue la elaborada con quitosano ( $Ra=2.06 \pm 0.62$  nm,  $Rq=2.65 \pm 0.34$  nm). Arzate-Vázquez y col. (2012) reportan que las películas elaboradas a base de quitosano presentan superficies lisas, homogéneas y sin irregularidades, debido a la cercanía entre las moléculas de quitosano al formar la película. Las películas elaboradas con AA ( $Ra=7.48 \pm 0.78$  nm;  $Rq= 9.64 \pm 0.48$  nm) y la mezcla Q-AA ( $Ra= 3.972 \pm 0.33$  nm;  $Rq= 5.45 \pm 0.25$  nm) presentaron los valores de rugosidad más altos, aunque se observó una disminución de rugosidad al adicionar el quitosano, esto puede ser causado por que la acetilación del almidón conduce a la reorganización estructural debido al impedimento estérico, dando lugar a que las moléculas de almidón ocupen un mayor espacio (Kaur y Singh, 2016) originando superficies más rugosas en las películas que contienen AA.

Bonilla y col. (2013) reportan un fenómeno similar en películas de almidón, en donde observaron que la adición del quitosano en las películas producía superficies más lisas debido a la alta compatibilidad entre los dos polímeros, ya

que la separación de fases podría causar irregularidades en la superficie y por lo tanto mayor rugosidad.

## 6.2 Propiedades mecánicas (Dureza y Elasticidad)

Las propiedades mecánicas evaluadas para las películas comestibles fueron elasticidad y dureza, de los resultados obtenidos las películas de Q-AO y Q-AA fueron las más elásticas y menos duras, mientras que la película de Q-AC fue la más dura y menos elástica.

Las películas con valores de dureza mayores se presentaron en las elaboradas con almidón (AC, AO, AA), esto se debe a la presencia de amilosa, ya que de esta depende la capacidad de los almidones para formar películas, entre mayor sea el contenido de amilosa se obtendrán películas más rígidas y fuertes (Elsabee y Abdou, 2013). Sin embargo, se puede observar que al adicionar el quitosano la dureza de las películas disminuye significativamente en comparación a las películas de almidón sin mezclar, siendo más notorio en las películas con AA, al disminuir la dureza de  $198.77 \pm 22.55$  a  $3.97 \pm 0.73$  MPa. Esto podría explicarse debido a la interacción de los grupos acetilo con el Q, que promueven una estructura más abierta y por tanto menos dura

De los resultados obtenidos se puede apreciar que las películas elaboradas con quitosano resultaron más elásticas al presentar valores de módulo elástico menores, esto se puede deber a una interacción más efectiva entre el A y el Q, al momento de realizar la mezcla de quitosano con los tres tipos de almidón utilizados (Q-AA, Q-AO, Q-AC). El aumento de la elasticidad y disminución de la dureza de las películas comestibles elaboradas a partir de la mezclas se debe a que la incorporación de quitosano en las películas contribuye al aumento de fuerzas de van der Waals como consecuencia a su mayor capacidad para formar enlaces de hidrógeno haciendo más flexibles a las películas, mientras que la adición del Q resulta en una estructura más voluminosa, que por no tener interacciones covalentes o iónicas, haciendo las películas menos duras (Bonilla y col. 2013).

### 6.1.1 Color

El color es una propiedad importante de las películas para definir su aplicación ya que esta afectará la apariencia del producto en el cual va a ser utilizada. La adición de Q a las películas de AO y AA provocó una disminución en luminosidad de estas mientras que para la mezcla de Q-AA se obtuvo el valor de luminosidad más alto ( $91.14 \pm 0.08$ ), es decir fue la más clara. Las películas elaboradas a base de los tres almidones no presentan diferencia significativa en el valor de luminosidad, esto concuerda con lo reportado por Levien-Vanier y col. (2012) quienes reportan que el proceso de oxidación de los almidones no modifica los parámetros de color. Para el valor cromático de  $a^*$  todas las películas tienden a una coloración roja, sin embargo, la película de Q presenta diferencia significativa con respecto a las películas elaboradas a base de almidón. También se puede apreciar que la adición de Q a las películas de almidón proporcionó una pigmentación amarilla, esto concuerda con Kurek y col. (2014), quienes, al adicionar Q a películas de proteína de suero de leche, les proporcionó una coloración amarilla, además de aumentar el valor de  $\Delta E^*$ ; los valores de luminosidad y los parámetros cromáticos ( $a^*$ ,  $b^*$ ) y  $\Delta E$  son similares a los previamente reportados (Rivero y col., 2009; Jridi y col., 2014; Kurek y col., 2014).

### 6.3 Caracterización química (Espectroscopia Raman)

Para la caracterización química se utilizó espectroscopia Raman ya que es un tipo de espectroscopia capaz de identificar compuestos de carácter polar y no polar, con anillo y dobles o triples enlaces en su estructura, además es capaz de identificar modos vibracionales que son típicamente de intensidad débil en el espectro IR (Holder y col., 2012).

Las interacciones químicas de los compuestos de las películas comestibles se identificaron por la aparición y desaparición de señales en el espectro Raman, lo cual indica la presencia o ausencia de determinados grupos funcionales. De los espectrogramas obtenidos se observa que el quitosano interactúa con los tres almidones y de una manera diferente, esto se debe al proceso de modificación de

cada almidón. En el espectro de la película de Q-AA (Figura 19) se observó la desaparición de una señal en  $542\text{ cm}^{-1}$ , la cual es característica del quitosano y representa vibraciones fuera del plano de flexión de los grupos NH, C=O y CH<sub>3</sub> (Zajac y col. 2015) los cuales podrían estar reaccionando con el almidón acetilado, en el caso de NH siendo el nitrógeno más electronegativo que el hidrógeno puede formar enlaces con el almidón, el grupo carbonilo es polar en donde el átomo de oxígeno tiene una carga parcial negativa y el átomo de carbono una carga parcial positiva, por lo que el átomo de oxígeno tiene una electronegatividad mayor y éste puede reaccionar fácilmente con los grupos OH del almidón. Los grupos acetilo (-COCH<sub>3</sub>) del almidón acetilado pueden estar reaccionando con los grupos NH del quitosano para formar nuevos enlaces, en este mismo espectrograma (Figura 19) se observa la desaparición de las señales  $890\text{ cm}^{-1}$  y  $1220\text{ cm}^{-1}$  características del anillo pirenóide de quitosano y a vibraciones en el plano de flexión  $\gamma(\text{OH}\dots\text{O})$  y CH respectivamente (Zajac y col., 2015) siendo grupos con los que este reaccionando el almidón, además se puede observar una disminución en  $653\text{ cm}^{-1}$  y  $1202\text{ cm}^{-1}$  señales atribuidas al almidón que representan un estiramiento del enlace C-C y C-O y al enlace C-O-C del anillo de la piranosa del almidón (Holder y col., 2012) por lo que puede decirse que el anillo se rompe y el almidón pierde su estructura. Las vibraciones causadas por el estiramiento del carbonilo ocurren generalmente en la región de  $1730\text{ cm}^{-1}$ - $1645\text{ cm}^{-1}$ , sin embargo, la intensidad de la señal es débil en Raman, probablemente causado por la conjugación de enlace del grupo carbonilo con el anillo piranosa (Joseph y col., 2012). Esta señal no se observa en el espectro del AA debido a lo mencionado o también por el grado de sustitución del almidón; por otro lado, se observó que en el espectro de la mezcla del almidón acetilado con el quitosano surge una banda a  $1695\text{ cm}^{-1}$  que podría indicarnos la formación de grupos C=O.

En el espectro de la película de Q-AO (Figura 20), en esta mezcla al igual que en el caso anterior desaparece la señal a  $542\text{ cm}^{-1}$  del quitosano, esta desaparición pudo deberse por la posible interacción entre los grupos NH y C=O del quitosano con los grupos carboxilo o carbonilo del almidón oxidado. En medio ácido el

oxígeno del grupo carbonilo puede protonarse siendo este más reactivo y provocándose la adición de un nucleófilo que podría ser el grupo NH del quitosano y posteriormente produciendo la salida de agua. Se observó también que en el espectro de Q-AO (Figura 20) hubo decaimiento de señales del almidón a  $778\text{ cm}^{-1}$  y  $896\text{ cm}^{-1}$ , las cuales pueden ser atribuidas a flexión de los enlaces C-C-O (Holder y col., 2012) y a un estiramiento del anillo pirenoide y  $\nu(\Phi)+\rho(\text{CH}_2)$  del quitosano. Se observó el surgimiento de una señal a  $1730\text{ cm}^{-1}$ , que puede ser atribuida a la formación de grupos C=O (Ulahannan y col., 2015).

En la Figura 21 se muestra el espectro de la mezcla de almidón ceroso con quitosano en donde se observó la desaparición de señales características del quitosano a  $421\text{ cm}^{-1}$  y  $924\text{ cm}^{-1}$  y  $1409\text{ cm}^{-1}$ , estas señales se puede atribuir a una flexión fuera del plano de OH y del anillo pirenoide  $\gamma(\text{OH}) + \gamma(\Phi)$ ; a vibraciones del enlace C-N y a vibraciones simétricas  $\delta_s(\text{CH}_3) + \delta(\text{CH})$ , respectivamente, cabe señal que estas señales no desaparecen al realizar la mezcla de quitosano con los almidones modificados (AA y AO), también se presenta la aparición de la señal a en el rango de  $1695$  a  $1737\text{ cm}^{-1}$ , la cual se puede atribuir a vibraciones causadas por el estiramiento de grupos C=O (Zhang y col., 2010). Finalmente se realizó la comparación entre las tres mezclas realizadas (Q-AC, Q-AO y Q-AA) en donde se detectaron diferencias, en el caso de la mezcla Q-AC no se observó señal a  $533\text{ cm}^{-1}$ ,  $756\text{ cm}^{-1}$  y a  $1398\text{ cm}^{-1}$  que pueden atribuirse a una torsión del enlace C-O, a una flexión del enlace C-C-O del almidón, y a una flexión den enlace C-C-H del almidón (Holder y col., 2012), respectivamente; por lo que en la mezcla de Q con el AC pudo interaccionar con el quitosano de manera diferente que con el AO y el AA, al tener estos grupos carboxilo, carbonilo y acetilo respectivamente.

## 7. CONCLUSIÓN

La adición de quitosano en las películas de los almidones mejoró sus propiedades de barrera, mecánicas y ópticas al observarse la disminución del contenido de humedad, PVA y % de solubilidad, así como el aumento de la elasticidad, disminución de la dureza de las películas y al presentarse altos valores de luminosidad.

La película de Q-AO presentó el menor espesor, contenido de agua, % de solubilidad y permeabilidad al vapor de agua que todas las demás películas de las mezclas. Así mismo esta película presentó menor dureza y rugosidad, siendo la más elástica junto con la película de Q-AC.

Por medio de la espectroscopía Raman se comprobó que cada almidón tuvo una interacción diferente con el quitosano lo que le proporcionó a cada película propiedades de barrera y mecánicas diferentes. Se observaron diferentes interacciones de los grupos OH libres, C=O y NH del quitosano con cada tipo de almidón, de igual forma se observaron interacciones de grupos C-O-C del anillo de la piranosa y C-C del almidón con el quitosano.



## 8. REFERENCIAS

**Aguilar-Mendez** MA. Propiedades Físicas y Mecánicas de películas Biodegradables y su empleo en el recubrimiento de Frutos de Aguacate. Tesis para obtener el grado de Maestro en Tecnología Avanzada. Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Avanzada. IPN. **2005**.

**Al-Hassan** AA, Norziah MH. Starch-gelatin edible films: wáter vapor permeability and mechanical propertie as affected by platicers, *Food Hydrocolloid* **2012**; 26:108-117.

**Alvarado-González** JS, Chanona-Pérez JJ, Welti-Chanes JS, Calderón-Domínguez G, Arzate-Vázquez I, Pacheco-Alcalá SU, Garibay-Febles V, Gutiérrez-López GF. Optical, microstructural, functional and nanomechanical properties of *Aloe vera* gell/ gellan gum edible films. *Rev Mex Ing Quim* **2010**;11(2):193-210.

**Alves** DV, Mali S, Beléia A, Grossmann EMA. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *J Food Eng* **2007**;78:941-946.

**Antoniou** J, Liu F, Majeed H, Zhong F. Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. *Food Hydrocolloid* **2015**;44:309-319.

**Arzate-Vázquez** I, Chanona-Pérez JJ, Rodríguez-Castro GA, Fuerte-Hernández, A, Méndez-Méndez JV, Gutiérrez-López, GF. Indentation Technique: Overview and Applications in Food Science en *Food Nanoscience and Nanotechnology*. Ed. Food Engineering Series. New York, **2015**:81-98.

**Arzate-Vázquez** I, Chanona-Pérez JJ, Calderón-Domínguez G, Terres-Rojas Eduardo, Garibay-Febles V, Martínez-Rivas A, Gutiérrez-López GF. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydr Polym* **2012**;87:289-299.

**ASTM**. Standard test methods for water vapor transmission of materials E 96-80. In Annual book of ASTM standards. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. **1989**;745-754.

**Bautista-Baños** S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez del Valle, Bosquez-Molina, E, Sánchez-Domínguez D. Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Rev Iberoam Tecnol Postcosecha* **2005**;7(1):1-6.

**Becerril** R, Manso S, Nerin C, Gómez-Lus R. Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control* **2013**;2:404-408.

**BeMiller** JN. Modified starches, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2a. edición. USA. **2003**:576-579.

**Bertuzzi** MA, Armada M, Gottifredi JC. Physicochemical characterization of starch based films. *J Food Eng* **2007**;82:17-25.

**Betancourgh-G** D, Gómez-C JF, Mosquera JC, Tirado-Mejía L. Análisis por difracción de rayos X de rocas provenientes de región esmeraldífera. *Scientia Et Technica* **2010**;44:257-260.

**Bof** MJ, Bordagaray VC, Locaso DE, García MA. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocolloid* **2015**;51:281-294.

**Bonilla** J, Talón E, Atarés L, Vargas M, Chiral A. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. *J Food Eng* **2013**;118:271-278.

**Bourbon** AI, Pinheiro AC, Cerqueira MA, Rocha CMR, Avides MC, Quintas MAC, Vicente AA. Physicochemical characterization of chitosan based films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *J Food Eng* **2011**;106:111-118.

**Chang** SH, Lin HTV, Wu GJ, Tsai GJ. pH Effects on solubility, zeta potential, an correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan, *Carbohydr Polym* **2015**;134:74-81.

**Cheng** SY, Wang BJ, Weng Y.M. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *LWT-Food Science and Technology* **2015**; 63:115-121.

- Chiumarelli** M, Hubinger DM. Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch-Caranuba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloid* **2012**; 28: 59-67.
- Das** AB, Singh G, Singh S, Charanjit SR. Effect of acetylation and dual modification on physico-chemical, rheological and morphological characteristics of sweet potato (*Ipomoea batatas*) starch. *Carbohydrate Polym* **2010**; 80:725-732.
- Davidson** PM, Cekmer-Bozkurt H, Monu EA, Techathuvana C. The use of natural antimicrobials in food. *Handbook of Natural Antimicrobial for Food Safety and Quality* **2015**:1-27.
- Delves-Broughton** J. Bacteria: Nisin, *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2<sup>a</sup> edición. UK: Elsevier, **2014**:187-193.
- Díaz** MM, Collazo CI. Síntesis y caracterización del almidón oxidado para su posterior evaluación como agente aglutinante en tabletas. Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos, *Rev Cubana Farm* **1999**;33(2):98-103.
- Domínguez-Courtney** MF, Jiménez-Munguía MT. Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* **2012**;6(2):110-121.
- Ducamp-Collin** M-N, Reyes M, Lebrun M, Freire M. Fresh cut mango fruits: Evaluation of edible coatings. *Acta Horti* **2009**;820:761-767.
- Elsabee** MZ, Abdou ES. Chitosan based edible films and coatings: A review, *Mat Sci Eng C-Biom* **2013**;33:1819-1841.
- Escamilla-García** M, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez JJ, Farrera-Rebollo, RR, Andraca-Adame, J., Arzate-Vázquez I, Mendez-Mendez JV, Moreno-Ruíz, L.A. Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. *Int J Biol Macromol* **2013**;61:196-203.
- Escamilla-García**, M., Alvarado-González, J.S., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J.J., Méndez-Méndez, J.V., Perea-Flores, M. J., Farrera-Rebollo, R.R. Tools for the Study of Nanostructures in Food Nanoscience and Nanotechnology. New York: Ed. Food Engineering Series, **2015**:5-38.

**Fabra MJ**, Hambleton A, Talens P, Debeaufort F, Chiralt A. Effect of ferulic acid and  $\alpha$ -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. *Food Hydrocolloid* **2011**;25:1441-1447.

**Fakhouri**, FM, Martelli SM, Caon T, Velasco JI. Innocentini- Mei, L.H. Edible films and coatings base on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated red crimson grapes. *Postharvest Biol Tec* **2015**;109:57-64.

**Fuentes-Fuentes** M<sup>a</sup>V. Propiedades mecánicas de la dentina humana. *Av. odontoestomatol* **2003**;20(2):79-83.

**García**, NL, Ribba L, Dufresne A, Aranguren M, Goyanes, S. Influencia del tipo de almidón empleado como matriz en las propiedades físico-químicas de nanocompuestos biodegradables. *Rev LatinAm Metal Mater* **2009**; S1(3):903-909.

**García-Tejeda** YV, Salinas-Moreno Y, Martínez-Bustos F. Acetylation of normal and waxy maize starches as encapsulating agents for maize anthocyanins microencapsulation. *Food Bioprod Proc* **2015**;174:31-36.

**Ge** L, Li X, Zhang R, Yang T, Ye X, Li D, Mu C. Development and characterization of dialdehyde xanthan gum crosslinked gelatin based edible films incorporated with amino-functionalized montmorillonite. *Food Hydrocolloid* **2015**; 51:129-135.

**Gennadios** A, Weller CL, Gooding CH. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *J Food Eng* **1994**;21:395-409.

**Genskowsky** E, Puente LA, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J, Muñoz LA, Viuda-Martos M. Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*), *Food Sci Technol* **2015**;64:1057-1062.

**Ghamsemlou** M, Khodaiyan F, Oromiehie A. Physical, mechanical, barrier and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from Kefiran. *Carbohydr Polym* **2011**;84(1):477-483.

**Guibal** E. Heterogenous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Prog Polym Sci* **2005**;30:71-109.

**Gutiérrez** TJ, Tapia MS, Pérez E, Famá L. Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. *Food Hydrocolloid* **2015**;45:211-217.

**Hernández** BPL, Delgado BAC, Sánchez MSA, Castillo VHS, Porras NDP. Efecto del recubrimiento a base de almidón de yuca modificado sobre la maduración de tomate. *Rev Lasall Inv* **2011**;8(2):97-103.

**Higueras**, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R., Rollini, M. Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N<sup>α</sup>-dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *Int J Food Microbiol* **2013**;3:339-345.

**Hinojosa** RM, Reyes MM. La rugosidad de las superficies: Topometría. *FIME-UANL* **2001**;4:27-33.

**Holder** HB. Characterization of Starch by Vibrational Spectroscopy. *Dissertations & Theses in Food Sci Technol* **2012**:12.

**Ho** WK, Ooi WC, Mwangi WW, Leong FW, Tey TB, Chan Eng-Seng. Comparison of self-aggregated chitosan particles prepared with and without ultrasonication pretreatment as Pickering emulsifier. *Food Hydrocolloid* **2016**; 52:827-837.

**Jacobsson** P, Johanson P. Vibrational Properties: Raman and Infra Red. En: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. Illinois, USA **2009**:802-812.

**Jidri** m, Hajji S, Ayed BH, Lassoued I, Mbaerk A, Kammoun M, Souissi N, Masri M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *Int J Biol Macromol* **2014**;67:373-379.

**Jost** V, Kobsik, K, Schmid, M, Noller K. Influence of plasticizer on the barrier on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. *Carbohydr Polym* **2014**;110:309-319.

**Joseph** L, Sajan D, Reshmy R, Sasi ABS, Erdogdu Y, Thomas KK. Vibrational spectra, structural conformations, scaled quantum chemical calculations and NBO analysis of 3-acetyl-7-methoxycoumarin. *Spectrochim Acta A* **2012**; 99:234-247.

**Kanatt** RS, Chander R, Sharma A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chem* **2007**;107:845-852.

**Lu D**, Shen X, Cai X, Yan F, Lu W, Shi Y. Effects of heat stress during grain filling on the structure and thermal properties of waxy maize starch. *Food Chem* **2014**;143:313-318.

**Kaur L**, Singh J. Starch: Modified starches. *Enc Food Health* **2016**:152-159.

**Ma Q**, Zhang Y, Critzer F, Davidson MP, Zivanovic S. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil, *Food Hydrocolloid* **2015**;52:533-542.

**Mata-Cabrera F**, Hanafi I, Khamlichi A, Jabbouri A, Bezzazi M. Predicción de rugosidad en maquinado de compuestos con base de Peek usando metodología de superficie de respuesta. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, volumen **2013**; 14: 463-474.

**McDonagh P**. Native, modified and clean label starches in foods and beverages, Natural food additives, ingredients and flavourings. *Food Sci Technol Nut* **2012**;1: 162-174.

**Mehdizadeh T**, Tajik H, Rozavi-Rohaní SM, Oromiehie A.R. Antibacterial-antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. *Vet Res Forum* **2012**;3:167-173.

**Mei J**, Yuan Y, Wu Y, Li Y. Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *INT J BIOL MACROMOL* **2013**;56:17-21.

**Morris VJ**. Atomic force microscopy (AFM) and related tools for the imaging of foods and beverages on the nanoscale. *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries*. Ed. Woodhead Publishing. Oxford **2012**;99-148.

**Nur-Hanani ZA**, McNamara J, Roos YH, Kerry JP. Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin-based composite films. *Food Hydrocolloid* **2013**;31(2):264-269.

**Ollé-Resa PC**, Jagus JR, Gerschenson NL. Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. *Mat Sci Eng C-Biomim* **2014**;40:281-287.

**Park B.** Nanotechnology and the packaging of food and other fast-moving consumer goods. *Markets, Materials and Technologies*. Woodhead Publishing Food Science, Technology and Nutrition. UK. **2013**:241-258.

**Pattanayaiying R,** H-Kittikun A, Cutter NC. Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *Int J Food Microbiol* **2015**;207:77-82.

**Peelman N,** Regaert P, De Meulenaer B, Adons D, Peeters R, Cardon L, Impe FV, Devlieghere, Application of bioplastics for food packaging, *Food Sci Technol* **2013**;32:128-141.

**Peñaranda-Contreras OI,** Perrilla-Perrilla JE, Algecira-Enciso NA. A review of using organic acids to chemically modify starch. *Ingeniería e Investigación*. 2008;28 (3):47-52.

**Pereda M,** Ponce AG, Marcovich NE, Ruseckaite RA, Martucci JF. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity, *Food Hydrocolloid* **2011**; 25:1372-1381.

**Peretto G,** Du WX, Avena-Bustillos RJ, Sarreal LSB, Hua TSS, McHugh TH. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapor released from edible films. *Postharvest Biol Technol* **2014**;89:11-18.

**Prakash MJ,** Sivakumar V, Thirugnanasambandham K, Sridhar R. Response surface modeling and analysis of barrier and optical properties of maize starch edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2013**;60: 412-421.

**Razavi SMA,** Amini AM, Zahedi Y. Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticizer type and concentration. *Food Hydrocolloid* **2015**;43:290-298.

**Rincón AM,** Ranched LB, Aragoza LE, Padilla F. Efecto de la acetilación y oxidación sobre algunas propiedades del almidón de semillas de Fruto de pan (*Artocarpus altilis*). *Sociedad Latinoamericana de Nutrición* **2007**;57(3):287-294.

**Rivero S,** García MA, Pinotti A. Composite an bi-layer films based on gelatin an chitosan. *J Food Eng* **2009**;90:531-539.

**Ruiz AG.** Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Ingeniería y Ciencia* **2006**:2(4)5-28.

**Sanjurjo** K, Flores S, Gerschenson L, Jagus R. Study of the performance of nisin supports in edible films. *Food Research International* **2006**;39:749-754.

**Santacruz** S, Rivadeneira C, Castro M. Edible films based on starch and chitosan, Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloid* **2015**;49:89-94.

**Tharanathan** RN. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *J Food Technol* **2003**;14:71-78.

**Thischenko** G, Simunek J, Brus J, Netopilík M, Pekárek M, Walterová Z, Koppová I, Lenfeld J. Low-molecular-weight chitosans: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polym* **2010**;86:1077-1081.

**Tofiño** A, Fregene M, Ceballos H, Cabal D. Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación. *Acta Agron, Universidad Nacional de Colombia Palmira, Colombia*, **2006**;55:1.

**Ulahannan** TR, Panicker YC, Varghese TH, Musiol R, Jampilek J, Alsenoy VC, War AJ, Srivastava SK. Molecular structure, FT-IR, FT-Raman, NBO, HOMO and LUMO, MEP, NLO and molecular docking study of 2-[(E)-2-(2-bromophenyl)-ethenyl]quinoline-6-carboxylic acid. *Spectrochim Acta A* **2015**;151:184-197.

**Van-Duyne** R.P., Haynes, C.L. Raman Spectroscopy. En: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. 3a edición. Illinois, USA. Ed. Academic Press, **2014**:845-866.

**Wang** Y, Rakotonirainy M, y Papua W. Thermal behavior of Zein based biodegradable films. *Starch/ Stärke* **2003**;55:25-29.

**Wilkins** MR, Wang P, Xu L, Niu Y, Tumbleson ME, Rausch KD. Variability in starch acetylation efficiency from commercial waxy corn hybrids. *Cereal Chem* **2003**;80(1):68-71.

**Zajac** A, Hanuza J, Wandas M, Dyminska L. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**;134:114-120.

**Zhang** K, Peschel D, Helm J, Groth T, Fischer S. FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity. *Carbohydrate Polym* **2011**;83:60-65.



