



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN EMPAQUE
INTELIGENTE A BASE DE ALMIDÓN Y QUITOSANO
ADICIONADO CON BETALAÍNA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

NOEMI TAKEBAYASHI CABALLERO

DIRIGIDA POR

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Preparación y caracterización de un empaque
inteligente a base de almidón y quitosano adicionado
con betalaína

por

Noemi Takebayashi Caballero

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-289578



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN EMPAQUE
INTELIGENTE A BASE DE ALMIDÓN Y QUITOSANO
ADICIONADO CON BETALAÍNA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

NOEMI TAKEBAYASHI CABALLERO

DIRIGIDA POR

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

SINODALES

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA
DIRECTOR

Dr. VÍCTOR MANUEL CASTAÑO MENESE
CODIRECTOR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
SINODAL

Dr. JORGE NOÉL GRACIDA RODRÍGUEZ
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó gracias al financiamiento otorgado por el programa de Fondo “Química somos todos FCQ202121” de la Universidad Autónoma de Querétaro, al apoyo del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA, UNAM, Juriquilla), al Centro de Investigación en Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional (Campus Querétaro) y a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN) quienes me permitieron realizar experimentos en sus instalaciones. Quiero expresar mi agradecimiento especial a la Dra. Genoveva Hernández Padrón y al Dr. Manuel Aguilar Franco del CFATA por su valiosa colaboración en la caracterización de los empaques mediante espectroscopía infrarrojo y microscopía electrónica de barrido, por su guía y por brindarme su tiempo en el desarrollo de la tesis. Al Dr. Gonzalo Velázquez de la Cruz por su apoyo en las pruebas de permeabilidad las cuales eran fundamentales para la caracterización de los empaques y a la Dra. Georgina Calderón por su paciencia en el montaje de la técnica de tensión. A Park Systems por ayudarnos en la adquisición de las imágenes de AFM y en especial a Armando Melgarejo Mancilla por brindarme su ayuda en el desarrollo y comprensión de esta técnica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Monse quien fue mi apoyo incondicional a lo largo de la tesis. Por su eterna paciencia, dedicación y compromiso. Por haberme dado la oportunidad de asistir a congresos y vinculación. Por haber sido nuestro secuaz en cada brunch, intercambio y días festivos. Por no haberse rendido conmigo cuando las películas me quedaban llenas de varicela y mis cinéticas como electrocardiogramas. Siempre recordaré con mucho cariño estos años y usted siempre será una parte fundamental de estos recuerdos. Fue mi guía en todo momento y me siento extremadamente afortunada de haber coincidido.

Al Dr. Víctor por sus atinadas correcciones en este trabajo, así como su colaboración como parte de CFATA.

Al Dr. Regalado, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por sus pláticas siempre amenas.

Al Dr. Ángel por su apoyo técnico en el laboratorio, su pozole y sus chistes recurrentes. Entre limones de taquería, mangos de Japón, youtubers mafiosos—que siempre alegraron mi día.

Al Dr. Gracida. Saludos desde su natal Croacia a milonga de moro.

A la Dra. Blanca por haberse tomado su tiempo en explicarme el programa de biotecnología, aun cuando yo no era estudiante.

A la Universidad de Química y Facultad de Química por haberme dado la oportunidad de formarme en ella y haberme acogido durante estos 4 años. A cada docente quien contribuyó en mi formación.

Al laboratorio de biotecnología por brindarme un ambiente de aprendizaje y hacer del laboratorio mi lugar seguro.

A Wendy, Majo, Diana y Karla. A Wendy y Majo por habernos apoyado académicamente a lo largo de la carrera. A Diana y Karla por haber realizado la cinética de aceite, cuando no teníamos fe en que nuestro extracto de betalaínas tuviera actividad antimicrobiana. A Karla, por las innumerables veces de cardio-abdomen, por los jueves que nos quedábamos en el laboratorio toda la tarde, por checar si apagué el shaker, por aceptar manchar telas conmigo y por ser las más graciosas, junto con nuestras múltiples cédulas.

A María Castaño por haberme contactado con el Dr. Víctor y por haber sido testigo de cada “se cancela la tesis” por un experimento fallido.

A mis papás quienes han sido el pilar de mi educación; mis logros son gracias a ellos. Gracias por estar en todo momento.

A mis hermanos, a quienes les conté de principio a fin sobre mi tesis.

A todos mis profesores, en especial a Cristina Vergara, Guadalupe Reséndiz, Gaby Madrid, Claudia Hernández—quienes me impulsaron a embarcar en ciencias.

ÍNDICE GENERAL	Página
Contenido	
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Calidad en los alimentos	2
2.2 Microorganismos en los alimentos	2
2.3 Embalaje de alimentos	4
2.4 Empaques biodegradables y/o comestibles	5
2.5 Actividad antimicrobiana de empaques.....	6
2.6 Empaques inteligentes	7
2.7 Quitosano	8
2.8 Almidón	10
2.9 Pigmentos	11
2.10 Actividad antimicrobiana de los pigmentos	13
2.11 Betalaína	13
2.12 Aceites esenciales.....	15
2.13 Aceite esencial de romero	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 General	19
4.2 Específicos	19

5. METODOLOGÍA.....	20
5.1 Extracción de pigmentos de betabel	20
5.2 Análisis de betalaínas	20
5.3 Colorimetría de las betalaínas.....	21
5.4 Actividad antimicrobiana de betalaínas ante <i>L. innocua</i> y <i>S. enterica</i>	21
5.5 Elaboración de empaques.....	22
5.6 Evaluación de cambios de color en los empaques.....	23
5.7 Caracterización del empaque inteligente	24
5.7.1 Caracterización física	24
5.7.1.1 Espesor del empaque	24
5.7.1.2 Solubilidad.....	24
5.7.1.3 Permeabilidad a vapor de agua.....	25
5.7.1.4 Propiedades mecánicas	25
5.7.2.1 Microscopía electrónica de barrido.....	25
5.7.2.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	26
5.7.3 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	26
5.7.4 Actividad antimicrobiana	26
5.8 Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1. Análisis de betalaínas	28
6.2. Efecto de pH en las betalaínas.....	31
6.3. Curvas de crecimiento y determinación de parámetros cinéticos.....	32
6.3.1. Actividad antimicrobiana de las betalaínas.....	32
6.3.2. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de romero.....	36
6.3.3. Actividad antimicrobiana de betalaínas y aceite esencial.....	39

6.4. Elaboración de empaques.....	41
6.5. Efecto de pH en el color de los empaques	43
6.6. Caracterización del empaque.....	50
6.6.1 Propiedades físicas de los empaques	50
6.6.2. Propiedades mecánicas de los empaques.....	52
6.6.3 Microscopía electrónica de barrido.....	54
6.6.5. Microscopía de Fuerza Atómica	55
6.6.4. FT-IR	59
6.6.6. Actividad antimicrobiana de los empaques	67
7. CONCLUSIONES.....	69
8. REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Enfermedades causadas por el consumo de alimentos.....	3
2. Aplicaciones y materiales de empaques inteligentes.....	8
3. Contenido total de betalaínas y estabilidad durante 72 h.....	29
4. Contenido de betalaínas por gramo de película.....	42
5. Propiedades físicas de los empaques	51
6. Propiedades mecánicas de los empaques.....	53
7. Rugosidad Cuadrática, Rugosidad de Pico a Valle, Sesgo de Rugosidad	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Grupos estructurales de la betalaína.	14
2. Espectro de absorción de barrido de extracto de betabel.	28
3. Espectro de absorción de extracto de betalaínas durante 72 h.	30
4. Cambio de color de las betalaínas en solución de película a diferentes valores de pH.	32
5. Curva de crecimiento en presencia de betalaínas.	33
6. Velocidad específica de crecimiento en presencia de betalaínas.	34
7. Tiempo de duplicación en presencia de betalaínas..	35
8. Curva de crecimiento en presencia de aceite esencial de romero.	36
9. Velocidad específica de crecimiento en presencia de aceite esencial de romero.	37
10. Tiempo de duplicación en presencia aceite esencial de romero.	38
11. Curva de crecimiento en presencia de betalaínas y aceite esencial de romero.	39
12. Velocidad de crecimiento específica en presencia de betalaínas y aceite esencial de romero..	40
13. Tiempo de duplicación en presencia de betalaínas y aceite esencial de romero..	41
14. Color de películas comestibles y sus parámetros de color.	43
15. Efecto del pH en el cambio de color de betalaínas.	44
16. Efecto del pH en el cambio de color del empaque de almidón con betalaínas.	45
17. Efecto de pH en los cambios de color del empaque a base de quitosano con betalaínas.	46
18. Cambio de color de la película almidón-quitosano adicionada con betalaínas..	47
19. Efecto de pH en el cambio de color de la película almidón-quitosano adicionada con betalaínas y aceite esencial de romero.	48
20. Cambio de color de la película almidón-quitosano adicionada con betalaínas y aceite esencial de romero (amarilla).	49
21. Micrografías de empaque con betalaínas	55

22. Micrografías 3D de Fuerza Atómica de la topografía superficial (2 μm x 2 μm) de los empaques..	56
23. Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de la superficie de los empaques (20 μm x 20 μm).....	59
24. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques de almidón.	63
25. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques de quitosano.....	64
26. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques almidón-quitosano.	65
27. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques almidón-quitosano con aceite esencial de romero.	66
28. Actividad antimicrobiana de las películas.	68

RESUMEN

Los empaques comestibles surgieron como una alternativa para reemplazar los envases de plástico. Los empaques comestibles son una matriz continua, delgada y de calidad alimentaria que se estructura en torno a un alimento utilizado para su conservación y envasado. Existe una tendencia creciente a elaborar empaques inteligentes. El objetivo del presente trabajo fue elaborar un empaque activo e inteligente a base de quitosano y almidón adicionado con aceite esencial de romero y betalaína como indicador de pH de los alimentos. Se determinó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero y betalaínas, así como el viraje de color de éstas de acuerdo al pH. Se evaluó el efecto de los componentes del empaque en la microestructura mediante SEM y AFM. Se observó el vire de color a diferentes escalas de pH, permaneciendo rojo en un pH de 1-6, morado en pH 7-9 y cambiando a color amarillo en pH mayor a 10. Se evaluó la actividad antimicrobiana ante *Listeria innocua* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. La concentración mínima bactericida ante *S. enterica* fue 50% (v/v) mientras que *L. innocua* se logró inhibir con sólo 2% (v/v). La adición del aceite mostró que la actividad de ambos antimicrobianos se potencializa. El cambio de color de los empaques depende de la matriz y su aplicación en el alimento. La mezcla de almidón y quitosano permitió mejorar las propiedades de barrera, el % de elongación y la actividad antimicrobiana. Debido a la dualidad de las betalaínas para actuar tanto como agente antimicrobiano e indicador de pH, se pueden incorporar a un empaque inteligente y activo, o bien, se puede combinar con aceites esenciales, dependiendo del alimento al cual se aplique.

ABSTRACT

Edible packaging surged as an alternative to replace plastic containers. Edible packages consist of a continuous, thin, food-grade matrix structured around a food and is used for preservation and packaging. Currently, there is an increasing trend to develop “smart packaging”. The aim of this work was to elaborate an active and intelligent package. The materials used for the film matrix were chitosan and starch. Rosemary essential oil and betalains from beetroot were added (as antimicrobial agent and pH indicator). The antimicrobial activity of rosemary essential oil and betalains was determined. The pH-dependent color change of betalains was observed. The effect of the package components on the microstructure was evaluated by using scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The color change was observed at different pH scales, remaining red at pH 1-6, purple at pH 7-9, and changing to yellow at pH>10. The antimicrobial activity against *Listeria innocua* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium was evaluated. The minimum bactericidal concentration against *S. enterica* was 50%, while *L. innocua* was inhibited by only 2%. The addition of rosemary essential oil showed that the activity of both antimicrobials was enhanced. The color change of the package depends on the matrix and its application. The mixture of both polymers (starch and chitosan) improved barrier properties, % elongation, and antimicrobial activity. Due to the duality of betalains to act as both an antimicrobial agent and pH indicator, betalains can be incorporated into a smart and active package, or combined with essential oils, depending on the specific food application.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los métodos más utilizados para extender la vida de anaquel de los alimentos es el empaquetado, ya que estos permiten la preservación y protección contra factores ambientales. Sin embargo, generalmente los empaques se elaboran a partir de polímeros sintéticos. No obstante, el uso indiscriminado de empaques sintéticos ha generado serios problemas ecológicos contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos de baja degradabilidad, lo que ha impulsado a la búsqueda de biopolímeros naturales. El uso excesivo de plástico ha alentado a buscar nuevas alternativas sustentables. Entre ellas se encuentra la elaboración de empaques comestibles a partir de polímeros naturales. El aprovechamiento de estos materiales como fuente de conservación y reciclaje se convierte en una excelente opción e innovación en el desarrollo de nuevos productos biodegradables. Los empaques pueden brindar, además, una protección contra el deterioro de alimentos por carga microbiana siendo esta una problemática que conduce al desperdicio de éstos. Para ello, se han propuesto el desarrollo de empaques activos e inteligentes. Para darle una funcionalidad extra, se ha intentado incorporar compuestos activos como agentes antimicrobianos cuyo propósito es minimizar la carga microbiana—misma que afecta a la calidad de alimentos. Recientemente, se ha propuesto incorporar componentes que detecten y brinden cambios en la frescura del alimento. Es por ello, la pertinencia de elaborar el presente empaque inteligente y activo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Calidad en los alimentos

El color, sabor y textura son importantes características que afectan a la percepción sensorial y la aceptación del alimento por el consumidor. El pH de cada producto es diferente, sin embargo, el intervalo promedio es entre 3.5 y 7 (Andrés-Bello y col., 2013). La vida de anaquel es un término para referirse al tiempo en el cual el producto es seguro para comer y tiene un sabor, textura y apariencia aceptables. Debido a que los alimentos se deben de empaquetar, transportar y distribuir antes de consumirlos, una vida de anaquel aceptable es de 2 semanas (Embuscado y Huber, 2009).

La contaminación derivada de microorganismos puede causar el deterioro de los alimentos. Los microorganismos pueden ser patógenos dando lugar a infecciones, o bien no patogénicos, que no causan infecciones, pero sí pueden cambiar la textura, sabor y color del alimento disminuyendo la bioseguridad y calidad de éstos (Cortés, 2017).

2.2 Microorganismos en los alimentos

Las enfermedades de transmisión alimentaria son una problemática de salud pública que se presenta mediante la contaminación de los alimentos, al aumentar la carga microbiana (Ospina y col., 2021). Entre los géneros de microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, se pueden mencionar a *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* y *Listeria* (Fernández del Campo, 2021). En el Cuadro 1, se enlistan algunas de las enfermedades presentes en los alimentos, así como, los microorganismos que la causan. Uno de los agentes de transmisión alimentaria es *Salmonella* (*Salmonella enterica* serotipos Typhimurium y Enteritidis) y se puede encontrar en la carne (Moon y col., 2020). Para mitigar la carga bacteriana durante la cadena alimentaria, muchos países utilizan productos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), sin embargo, en sistemas de refrigeración o congelación, algunas bacterias pueden

quedar con rupturas subletales permitiendo recuperarse. En el tiempo de refrigeración, las bacterias se someten a estrés químico y es posible que respondan al alterar su morfología celular, composición de membrana y metabolismo, posiblemente con una virulencia alterada (Weerasooriya y col., 2022).

Cuadro 1. Enfermedades causadas por el consumo de alimentos

Enfermedad	Microorganism o causante	Síntomas	Alimento de transmisión	Referencia
Gastroenteritis	<i>Campylobacter jejuni</i>	Fiebre, calambres abdominales, náuseas o vómitos, diarrea	Aves de corral	(Pigott, 2008)
Síndrome emético	<i>Bacillus cereus</i>	Náuseas y vómitos	Arroz frito y cocido, pasta, fideos y pasteles	(Bintsis, 2017)
Síndrome diarreico	<i>Bacillus cereus</i>	Diarrea y dolor abdominal	Productos cárnicos, sopas, verduras, budines, salsas, leche y productos lácteos	(Bintsis, 2017)
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>	Boca seca, vómitos, náuseas, diarrea y calambres abdominales, visión borrosa, párpados caídos, dificultad para hablar, dificultad para tragar y debilidad muscular. Parálisis descendente Parálisis difusa de los músculos respiratorios o cardíacos	Alimentos enlatados Verduras y hortalizas La bacteria Miel Productos cárnicos Pescados y mariscos alimentos enlatados o embotellados que estén abombados, tengan fugas o parezcan sospechosos de alguna manera.	(Chellapan di y Prisilla, 2018)
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	*Listeriosis gastrointestinal no invasiva: gastroenteritis febril típica *Listeriosis invasiva: septicemia o meningoencefalitis, muerte	Productos lácteos sin pasteurizar Carnes y aves crudas o mal cocidas Pescado y mariscos Vegetales crudos.	(Fan y col., 2019)
Salmonelosis	<i>Salmonella enterica</i>	Diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómitos, fiebre	Aves de corral (carne de pollo y la contaminación de la cáscara de huevo)	(El-Saadony y col., 2022)

En 2018, se confirmaron 94,203 casos de salmonelosis y 2,549 de listeriosis en Estados Unidos (Incili, 2020). La listeriosis es causada por otro agente de transmisión alimentaria, *Listeria monocytogenes*, y se puede encontrar en productos cárnicos (embutidos, carne cruda, carne procesada, entre otros). Esto se debe a que *Listeria monocytogenes* es capaz de colonizar las instalaciones de producción de alimentos como desagües o superficies difíciles de limpiar. Si las instalaciones de procesamiento de carne carecen de higiene, la carne se vuelve susceptible a contaminación (Zhang y col., 2021). De acuerdo con Zitz y col. (2011), *L. monocytogenes* y *L. innocua* se suelen encontrar juntas en ciertos alimentos como productos lácteos. Gómez y col., (2014) describieron que *L. innocua* se encuentra en carne y productos cárnicos y esta especie muestra resistencia ante los antibióticos (estreptomicina, eritromicina y cloranfenicol), por lo cual es necesario reducir su carga microbiana o poder monitorear para prevenir su consumo.

2.3 Embalaje de alimentos

El objetivo de los empaques de comida es proteger al alimento del ambiente externo. La forma más común de empaquetar comida es mediante el uso de materiales poliméricos (plásticos) ya que resulta barato. Sin embargo, el desecho descontrolado de envases de plástico es una de las principales causas de contaminación ambiental (Herrmann y col., 2022). Es importante destacar que no es posible reciclar o reusar el 30% de los empaques de plásticos por peligro de contaminación cruzada o bien, los empaques están compuestos de varios tipos de plásticos (Dilkes-Hoffman y col., 2018). De acuerdo con Gupta y col. (2022), entre 1950 y 2015, se fabricaron 8300 millones de toneladas métricas y se desecharon 6300 millones de toneladas métricas, donde el 79% de éstas terminaron en el ambiente, 12% se incineró y sólo el 9% se recicló. Es por ello, que se buscan alternativas biodegradables mediante el uso de bioplásticos.

2.4 Empaques biodegradables y/o comestibles

En comparación a la producción de plástico, de manera general, los polímeros biodegradables se producen en menor cantidad ya que tienen un mayor costo, propiedades mecánicas pobres y dado que pueden ser hidrofílicos, absorben mucha humedad. Aunque los empaques biodegradables no puedan sustituir a los plásticos se espera que puedan funcionar como barrera entre el ambiente y el alimento. Específicamente se busca una baja permeabilidad al vapor de agua para prevenir la desecación y la permeabilidad al oxígeno debe de ser baja para retardar la respiración, pero no extrema como para favorecer la producción de etanol bajo condiciones anaerobias (Mohamed y col., 2020).

En general, los empaques se encargan de actuar como barrera física entre el alimento y el exterior. Sin embargo, se debe de considerar la transferencia de masa entre el alimento y el empaque dado que se puede dar la transferencia de sustancias nocivas a los alimentos mediante difusión facilitada. Dicha transferencia a los alimentos es diferente para cada material polimérico (Hernández-González, 2019; Wrona y Nerín, 2020).

Un mecanismo de transferencia de vapor de agua es la difusión que se da por movimientos moleculares aleatorios. En el caso de los polímeros amorfos, moléculas pequeñas como el agua pueden penetrar la matriz estructural del polímero, ocasionando cambios físicos en el alimento. Otro parámetro a considerar son las propiedades de los polisacáridos para actuar como transportadores efectivos de gases (dióxido de carbono y oxígeno). Por ejemplo, el almidón interactúa con el agua al ser hidrofílico y dichas interacciones al tener un efecto plastificante, causan un aumento en la permeabilidad de los empaques (Vázquez-Luna y col., 2019).

Cada país estipula sus propias normas respecto a los empaques. México no tiene normatividades legales respecto a empaques que pueden entrar en contacto con alimentos, sin embargo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA

(FDA; por sus siglas inglés, Food and Drug Administration) estipula en el apartado de aditivos alimentarios, que un empaque queda exento de regulación si la sustancia que migre de éste, se considera no cancerígena y no implica problemas ambientales. En el caso de no ser considerado como seguro, está permitido agregar aditivos si el componente activo constituye 0.0001% de la dieta total (FDA, 2021).

Los empaques comestibles se pueden elaborar a partir de hidrocoloides, lípidos o una combinación de ambos. Se llama hidrocoloide a un polímero de cadena larga producto de la combinación de polisacáridos y proteínas (Iguasnia, 2021). Algunos de los polisacáridos utilizados en la elaboración de empaques son almidón, quitosano y celulosa, mientras que las proteínas más utilizadas son caseína, albumen, proteína de soya y gluten (Solano-Doblado y col., 2018). Estos compuestos hidrofílicos, como el almidón, se disuelven casi en su totalidad con el agua y forman un gel de aspecto transparente. Además, pueden desarrollar enlaces de hidrógeno con otros aditivos activos como colorantes, tienen buena barrera al oxígeno, pero mala barrera al vapor de agua. En cambio, los empaques a base de lípidos, como cera, resina, aceites, ácidos grasos libres, suelen ser opacos y actúan como barrera ante el vapor de agua (Kumar y col., 2021).

2.5 Actividad antimicrobiana de empaques

Existen diversas formas de preservar los alimentos mediante el uso de empaques, una de estas opciones es el uso de empaques activos. Los empaques activos sirven como vehículo para la incorporación de aditivos, antimicrobianos, saborizantes, sensores entre otros, permitiendo controlar la calidad del alimento, el crecimiento microbiano, y conservar las propiedades organolépticas del producto durante una mayor cantidad de tiempo, además, permiten la liberación controlada de los compuestos activos (Posada, 2022). Algunos compuestos activos empleados en este tipo de empaques son, eliminadores de oxígeno, absorbentes de etileno, absorbentes o emisores de dióxido de carbono, antioxidantes, antimicrobianos y controladores de humedad (Firouz y col., 2021).

Como agentes antimicrobianos, se han utilizado algunos ácidos orgánicos (láctico, acético, málico, cítrico) que reducen el pH, interrumpen el transporte de sustrato y reducen la fuerza protón motriz (Valdez-Valdez, 2018). También se ha usado la nisina la cual es un péptido antimicrobiano producido por bacterias ácido lácticas y su mecanismo consiste en la formación de poros en la membrana citoplasmática e inhibición de la síntesis de la pared celular (Ubaque, 2020). Además, se puede ocupar la lactoperoxidasa presente en la leche y es capaz de inhibir microorganismos mediante la oxidación de grupos sulfhidrilo de sus proteínas (Campos y col. 2011). O bien, se pueden usar nanopartículas (como dióxido de titanio y óxido de zinc) que inactivan microorganismos al oxidar fosfolípidos poliinsaturados de la membrana celular por la generación de radicales hidroxilo y especies reactivas al oxígeno (Sofi y col. 2018).

2.6 Empaques inteligentes

Los empaques inteligentes son una tecnología reciente empleada para monitorear los cambios de las condiciones internas y externas al comunicar sobre el estado de los alimentos. La calidad de la comida depende de la temperatura (desde su producción hasta su consumo), la carga microbiana y su metabolismo y la presencia de gases (Fernandez y col., 2022). En el Cuadro 2 se enlistan aplicaciones de materiales de empaques inteligentes.

Cuadro 2. Aplicaciones y materiales de empaques inteligentes.

Parámetro que detecta	Material de empaque	Detector	Alimento aplicado	Referencia
Crecimiento bacteriano	Agar soya tripticaseína enriquecido con 1% de glicerol	<i>Janthinobacterium sp</i> el cual produce un pigmento violeta (violaceína)	Carne de res molida	Mataragas y col. (2019)
pH	Ovoalbúminapropil englicol alginato en alcohol polivinílico con glicerol	Antocianinas de moras azules	Carne de cerdo	Zhang y col. (2022)
Temperatura	Soya Glicerol	Tintas termocrómicas: T16: Vire de rosa fuerte a rosa claro T>16 °C T33: Vire a negro T>33 °C	Alimentos que deban preservar la cadena de frío	Musso (2017)
Composición de gas	Alcohol polivinílico	Depuradores de etileno (cáscara de arroz y de huevo)	Jitomate	Haider y col. (2020)

2.7 Quitosano

Los empaques inteligentes se pueden elaborar a partir de quitosano. La quitina está presente en el caparazón de crustáceos marinos, paredes celulares de hongos, algas y protozoarios. Al desacetilar a la quitina se puede obtener al quitosano mediante procedimientos enzimáticos o químicos (Fuentes, 2021). El grado de desacetilación de la quitina se determina por el contenido de grupos aminos libres. La quitina con un grado de desacetilación arriba del 75% se conoce como quitosano (Agarwal y col., 2018) y entre menor sea el grado de desacetilación, mayor será su cristalinidad (Jaworska y col., 2003). Además, sus propiedades también dependen de su peso

molecular. El quitosano comercial viene en presentaciones de bajo, medio y alto peso molecular con 50-190, 190-310 y 310-375 kDa, permitiendo diferentes propiedades hidrofílicas (Mirzai y Asadabadi, 2022).

El quitosano tiene carga positiva debido a fuertes interacciones inter e intra moleculares por la presencia de puentes hidrógeno (Wang y col., 2021). Sebti y col. (2005) produjeron un recubrimiento de quitosano al 1% para inhibir a *Aspergillus niger* y atribuyen su total inhibición al grupo amino en C2, el cual crea una estructura policatiónica que puede interactuar con superficie celular microbiana. También, la baja disponibilidad de O₂ producida por las películas limita la germinación de esporas, así como una reducción de intercambio de humedad. Se ha propuesto que las cargas positivas del quitosano interactúan con las cargas negativas de las membranas celulares de los microorganismos, generando cambios en la permeabilidad celular y salida de constituyentes intracelulares (García Rincón, 2008).

Además, recubrimientos o películas a base de quitosano se han elaborado para extender la vida útil de las frutas debido que, aún cosechadas, éstas están en constante estado de transpiración y respiración. Durante la maduración de la fruta hay producción de etileno por lo que la vida útil y las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se generan durante el transporte de electrones mitocondriales, pueden causar daño celular, degradando la calidad de la fruta. Se especula que, debido al bajo peso molecular del quitosano, éste puede interactuar con la membrana celular del microorganismo, ingresar al citosol, interrumpir las funciones del ADN que conducen a la muerte celular microbiana (Nair y col., 2020).

Pavinatto y col. (2020) elaboraron recubrimientos a base de quitosano para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias en las fresas. Sin embargo, los recubrimientos resultaron frágiles por lo que no tienen elasticidad. Para mejorar este aspecto, se pueden usar plastificantes—glicerol en su caso—los cuales tienen afinidad con las cadenas poliméricas y permiten rellenar el espacio intramolecular. Una de las desventajas del quitosano es su permeabilidad al vapor agua El uso de glicerol,

permitió mejorar la resistencia a la permeación de vapor de agua, es decir, la película se vuelve más hidrófoba (Escobar, 2020).

2.8 Almidón

También se pueden elaborar películas a partir de almidón. El almidón está compuesto de amilosa y amilopectina. La proporción entre ambos depende de la fuente del almidón (Fonseca-García y col., 2021). El almidón es soluble en agua ya que las moléculas del solvente son muy pequeñas y rompen los enlaces de hidrógeno disociando las cadenas de amilosa y amilopectina. Cuando se retira el solvente mediante evaporación de una suspensión de almidón-agua, las películas se vuelven quebradizas por lo que se debe de agregar un plastificante. Este puede ser glicerol o sorbitol (Pelissari y col., 2019). Similar al quitosano, por sí solo el almidón tampoco tiene buenas propiedades mecánicas y al ser hidrófilo, es una mala barrera ante el agua (Hasan y col., 2020).

Es por ello que se han buscado alternativas, modificando al almidón. Escamilla-García y col. (2017) estudiaron diferentes almidones modificados, entre ellos, almidón acetilado. Las películas con almidón acetilado mostraron altos valores de permeabilidad al vapor de agua y altos valores de espesor debido a la introducción de grupos acetilo que provocan una mayor retención de agua dentro de la película después del secado. Sin embargo, al mezclar almidón acetilado con quitosano, la solubilidad mejoró debido a que el grupo acetilo del almidón interactúa con los grupos amino.

Mehboob y col. (2020) estudiaron el efecto del entrecruzamiento del almidón de sorgo y las características en la película. El entrecruzamiento permite que los gránulos sean resistentes al calor por lo que disminuye su solubilidad. Por otra parte, las películas de almidón acetilados presentaron menor resistencia a la tracción, pero resultaron ser más elásticas y flexibles que las películas de almidón nativo.

Huntrakul y col. (2020) elaboraron películas a base de aislado de proteína de guisante y almidón acetilado de yuca. Encontraron que la combinación de ambos materiales mejoró las propiedades mecánicas de la película, por ejemplo, la hidrofobicidad y transferencia de vapor de agua. Además, las películas de almidón mostraron deformación, mientras que la combinación, proteína con almidón, disminuyó la deformación durante el almacenamiento.

Yuan y col. (2021) prepararon una película a base de almidón con microemulsiones de aceite de tomillo. La película tuvo efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *S. aureus*, aunque tuvo mayor efecto sobre *S. aureus* debido a que las Gram positivas son más sensibles a los aceites. A pesar de su actividad antimicrobiana, su película resultó discontinua debido a la baja compatibilidad entre el aceite de tomillo y el almidón.

2.9 Pigmentos

Actualmente se usan colorantes sintéticos como clorofenol, cresol y rojo de metilo debido a su intensidad, estabilidad, versatilidad y bajo costo. Sin embargo, los colorantes sintéticos pueden llegar a ser tóxicos, ya que su molécula puede ser cancerígena, teratogénica o mutagénica. Esto, además de causar problemas en la salud humana, tendría consecuencias negativas para el ambiente. Es por ello, que la opinión pública puede expresarse en contra del uso de pigmentos sintéticos (Alizadeh-Sani y col., 2020).

Para esto, se ha intentado reemplazar lo sintético por pigmentos naturales debido a su bajo impacto ambiental y baja o nula toxicidad. Las frutas, por ejemplo, contienen diversos tipos de pigmentos como antocianinas, curcumina, carotenoides y clorofilas. Sin embargo, muchos pigmentos no se aprovechan debido a que están en la cáscara, por lo tanto, terminan en los desechos (Bhargava y col., 2020). Es por eso que esta alternativa podría generar productos de valor agregado al mismo tiempo que permita monitorear la calidad de los alimentos.

Los indicadores de pH cambian de color conforme cambia el pH. Debido que la producción de metabolitos depende de la fase de crecimiento de los microorganismos, el pH de los alimentos dependerá de su tiempo almacenamiento. Es decir, los metabolitos presentes al inicio de la curva de crecimiento de un microorganismo difieren a los que se encuentran en la fase estacionaria, por ende, presentando pH diferentes. Esto permite que los indicadores proporcionen información sobre la calidad del alimento (Balbinot-Alfaro y col., 2019). Hidayat y col. (2019) aplicaron un empaque inteligente con papel indicador sobre carne de res, el cual presentó un vire de color de naranja-rojo en los días 6-12 y después a púrpura en el día 16. El cambio de color se genera debido a la formación de nitrógeno de bases volátiles totales (TVBN) por descomposición de proteínas ante bacterias y enzimas que causan un cambio de pH. Ezati y col. (2021) produjeron una película inteligente a base de agar y almidón, añadiendo shikonina de *Lithospermum erythrorhizon* para empacar camarón. La adición de shikonina aumentó las propiedades de la película (resistencia mecánica y permeabilidad al vapor de agua). La película cambió de color, de rosa rojizo a violeta azulado, cuando se expuso al vapor de amoníaco.

Peralta et al (2019) prepararon películas a base de quitosano, gelatina y almidón, adicionada con extracto de jamaica (antocianinas) como indicador de pH. La película de quitosano no presentó muchos cambios, debido a que la película inicial era amarilla. En cambio, las películas de almidón y gelatina fueron cambiando de rojo a café-verdoso (ácido a básico) y en pH 13 se volvieron amarillas.

La adición de algunos pigmentos proporciona actividad antioxidante, antimicrobiana a los recubrimientos, sin embargo, éstos pueden afectar las propiedades mecánicas y físicas de los recubrimientos (Rodrigues y col., 2021).

2.10 Actividad antimicrobiana de los pigmentos

Los pigmentos se pueden encontrar de manera natural en frutas, flores y vegetales. Las antocianinas son pigmentos que sirven para atraer polinizadores y proteger de la luz ultravioleta. Algunos estudios realizados han demostrado que las antocianinas pueden tener actividad antimicrobiana ya que causan daño estructural, afectando la integridad de la pared celular, la membrana y la matriz intracelular (Guardiola, 2020; Cisowska y col., 2011).

No se han realizado estudios detallados sobre la actividad antimicrobiana de los pigmentos. Sin embargo, Liang y col. (2008) encontraron que las antocianinas de las uvas inhiben la síntesis de peptidoglicanos y ribosomas. Keceli y col. (2013) estudiaron carotenoides producidos por *Rhodotorula glutinis* spp. y los compararon con carotenoides de plantas como zanahoria, uva, berenjena, entre otros. Sus resultados indicaron que los carotenoides de zanahoria, perejil, berenjena y los producidos por *Rhodotorula* tienen efecto antibacteriano ante *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* cuando la concentración bacteriana fue de 10^3 cfu/mL.

2.11 Betalaína

El betabel (*Beta vulgaris*) es una fuente de betalaínas (Figura 1), que son pigmentos de nitrógeno solubles en agua con un anillo heterocíclico. Las betalaínas se pueden dividir en dos tipos. Primero están las betaxantinas que presentan una coloración amarillo-naranja; por otra parte, están las betacianinas como la betanina, isobetanina, neobetanina y prebetanina, las cuales tienen una coloración rojo-violeta (Devadiga y Ahipa, 2020). La betacianina, ha sido más estudiada debido a su tolerancia para reducir el color durante su almacenamiento y su actividad antioxidante (Zin y col., 2021).

El betabel ha llamado la atención de los consumidores debido a sus propiedades nutricionales ya que contiene polifenoles, betaína, fibra, nitrato, ácido ascórbico y carotenoides. Además, se le atribuye como aporte nutraceútico el potencial de disminuir la presión arterial. Es por eso, que productos a base de betabel como jugos, se han vuelto populares. Sin embargo, esto genera muchos residuos los cuales representan entre el 35 y 40% de la biomasa inicial (Fernando y col., 2021).

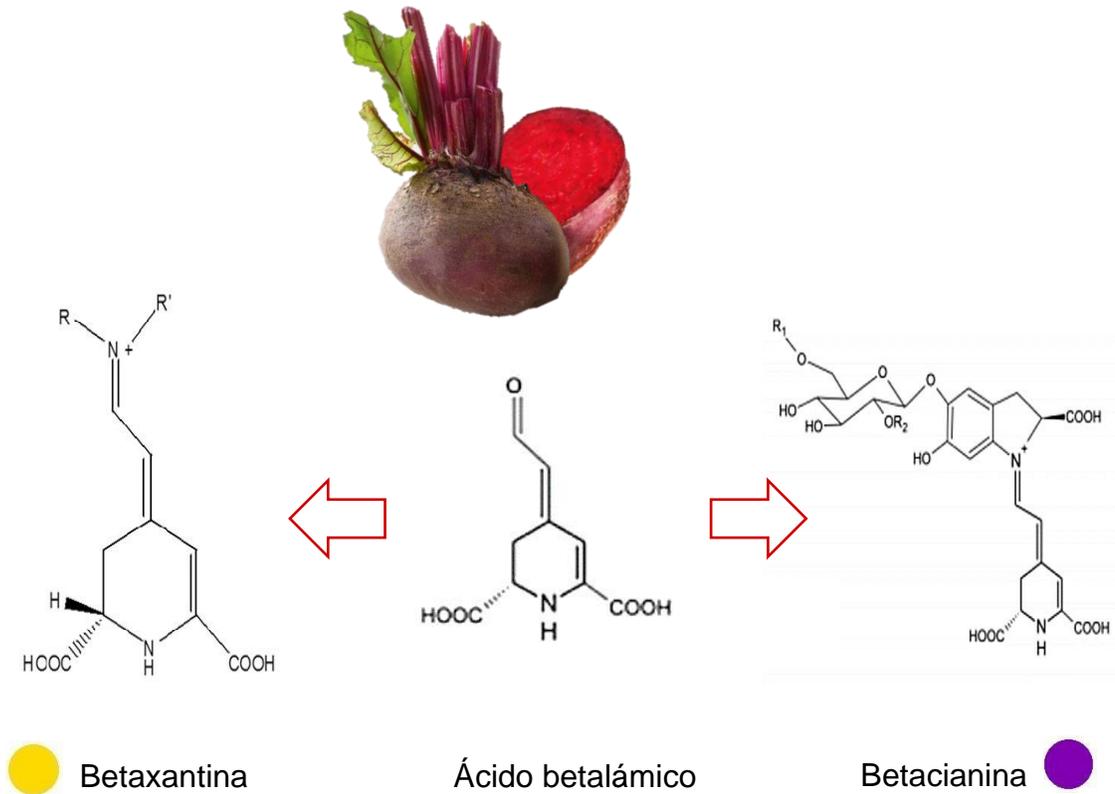


Figura 1. Grupos estructurales de la betaína. Fuente: elaboración propia.

Cazorla (2018) estudió las diferentes partes del betabel (cáscara, hojas, pulpa) en relación a las betaínas. Encontró que la mayor concentración de betaínas fue de 8.4 mg/mL en las hojas. Para esto extrajo las betaínas con etanol al 70% y construyó una curva patrón de betaína a una longitud de onda de 215 nm. Sin embargo, Abdo y col. (2020) encontraron que las cáscaras, pulpas y jugo de betabel mostraban mayor contenido de betaína en comparación a las hojas y a los tallos.

Para evitar la degradación de las betalaínas se pueden llevar a cabo procesos térmicos. Uno de ellos es el escaldado el cual permite inactivar enzimas como β -glucosidasa, polifenoloxidasa y peroxidasa, las cuales pueden degradar a las betalaínas. Otro tratamiento térmico es el tostado, el cual se ha asociado a un aumento en la actividad antioxidante. Sin embargo, el color de los pigmentos se ve afectado. Cuando se calienta el betabel, las betalaínas sufren una reducción colorimétrica de rojo a marrón por la producción de ácido betalámico (Castro y Lopez, 2014).

Durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, la betalaína se ve afectada por la temperatura. A temperaturas entre 50 y 80 °C, la estabilidad de la betalaína disminuye considerablemente, sin embargo, es estable a pH entre 3 y 7. A temperaturas elevadas, el pH óptimo (para evitar la degradación) de las betalaínas es de 6, en presencia de oxígeno es entre 5.5 y 5.8 y en condiciones anaerobias el pH óptimo se encuentra entre 4-5 (Herbach y col., 2006).

Algunos estudios han reportado que las betalaínas, como otros pigmentos, podrían tener actividades antimicrobianas posiblemente alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática por una disminución de los niveles de ATP y la pérdida de la fuerza protón motriz, causando la muerte celular (Čanadanović-Brunet y col., 2011).

2.12 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos que se obtienen de ciertas partes de las plantas (flores, capullos, semillas, hojas), por medio de destilación (Tohidi y col., 2019). Algunos estudios han reportado que son mezclas de veinte a sesenta componentes en concentraciones diferentes. En mayor cantidad se encuentran terpenos, terpenoides y otras moléculas con anillo aromático, las cuales tienen un papel primordial en el efecto biológico antimicrobiano de estos aceites (Bermúdez-Vásquez y col., 2019). Además, contienen compuestos volátiles como

aldehídos, cetonas, alcoholes, aminas, amidas, fenoles—los cuales otorgan efectos aromáticos e incluso, preservación de los alimentos (Bhavaniramy y col. 2019).

La hidrofobicidad de los aceites esenciales permite la disolución de la membrana lipídica, provocando un aumento en la permeabilidad, lo que ocasiona la pérdida del contenido celular vital y su posterior muerte. Una vez dentro de la célula, los aceites esenciales interfieren con el mecanismo de transporte de las moléculas, provocando así la inactivación celular (Mishra y col., 2020). Es por ello que los aceites esenciales presentan un amplio espectro antimicrobiano. Sin embargo, pueden ser más efectivos ante Gram positivas como lo reportado por Álvarez-Martínez y col. (2021) ya que la concentración mínima inhibitoria ante Gram positivas fue de 93.88 µg/mL mientras que para Gram negativas fue de 101.17 µg/mL.

2.13 Aceite esencial de romero

El romero es una planta aromática que en su composición presenta compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, diterpenos, triterpenos y polifenoles. Se puede obtener aceite esencial de sus hojas (Ushigua, 2021) el cual se ha demostrado ser antimicrobiano. Se han realizado diversos estudios sobre la actividad antimicrobiana del aceite de romero ante diferentes microorganismos y es efectivo ante *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis*, *Brochothrix thermosphacta* y *Enterobacteriaceae* (Nieto y col., 2018). de Medeiros Barbosa y col. (2016) reportaron que la concentración mínima inhibitoria (MIC) del aceite esencial de romero ante *L. monocytogenes* y *E. coli* es de 5 µL/mL mientras que para *S. Enteritidis* es de 10 µL/mL. Yeddes y col. (2019) elaboraron películas comestibles a base de gelatina con aceite esencial de romero, presentando actividad antimicrobiana ante *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Tsironi y col. (2022) incorporaron aceite esencial de romero en películas de suero lácteo para empaquetar carne de cordero molida. En el día 11, a diferencia de las películas con 0.5% de aceite, las películas con 1% tuvieron recuentos viables totales bajos de *Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta*,

bacteria ácido láctico (LAB), *Enterobacteriaceae* y levaduras. Mahcene y col. (2021) elaboraron una película comestible a base de alginato de sodio e incorporaron aceites esenciales, entre ellos, aceite de romero para conservar el queso casero. La incorporación de aceite esencial de romero inhibió el crecimiento de *Staphylococcus*, *Salmonella* y mohos en los quesos y, por su función de empaque, evitó que el queso se endureciera, a diferencia del queso sin película.

3. HIPÓTESIS

La adición de betalaína y aceite esencial de romero a empaques elaborados a base de quitosano-almidón permitirá el desarrollo de un empaque inteligente que será capaz de brindar actividad antimicrobiana e identificar los cambios de pH debido a un cambio de color ocasionado por los grupos estructurales de la betalaína y la alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática de los microorganismos.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Preparar y caracterizar un empaque inteligente a base de almidón y quitosano adicionado con betalaína

4.2 Específicos

- Extraer e identificar la betalaína proveniente de *Beta vulgaris* mediante espectrofotometría.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la betalaína y aceite esencial de romero (solos y en mezclas) ante *Listeria innocua* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
- Determinar el efecto antimicrobiano de la combinación de la betalaína y el aceite esencial de romero.
- Construir una escala colorimétrica en base a la escala de pH para el empaque inteligente.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del empaque inteligente con o sin adición de aceite esencial de romero, ante *Listeria innocua* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
- Hacer una caracterización física y química del empaque inteligente.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

Almidón acetilado-entrecruzado (Ingredion, San Juan del Río, Querétaro), quitosano (peso molecular medio, grado de desacetilación del 90%, Chemsavers, Bluefield, VA, EUA), sorbitol (>98%) y ácido láctico (Cat. W261114) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), betabel Cambray adquirido de Selecto Chedraui (Centro Sur, Querétaro).

Para las pruebas de microbiología, se utilizó *Listeria* Enrichment Broth (Difco, Detroit, MI, EUA), caldo soya tripticaseína y agar bacteriológico (BD Bioxon, Ciudad de México, México). Las cepas de *Listeria innocua* y *Salmonella enterica* fueron proporcionadas de la colección del Laboratorio de Biotecnología en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.1 Extracción de pigmentos de betabel

Se siguió el método propuesto por Halwani y col. (2018). Se colocó bagazo de betabel en ácido cítrico (2%) en una proporción 1:3 (p/v) y se dejó en agitación a temperatura ambiente (~25°C) durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró con papel Whatman No. 4 (20-25 µm). El filtrado se conservó en congelación (-4 °C) hasta su uso.

5.2 Análisis de betalaínas

Para verificar la presencia de betalaínas, se realizó un barrido entre 350 y 650 nm (Benites, 2015) en espectrofotómetro UV-VIS (Genesys 10, Thermo Scientific, MA, EUA). El contenido de betalaínas se determinó siguiendo el método descrito por Cejudo-Bastante y col. (2017). El extracto de betalaína se diluyó (1:10) con agua destilada y se midió el coeficiente de extinción a 535 nm. El contenido de betalaínas se calculó mediante la Ecuación (1).

$$\text{Contenido total de betalaína} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A \times V \times DF \times MW \times 1000}{\epsilon \times L \times W} \quad (1)$$

donde A es la absorbancia a 535 nm, V es el volumen del extracto (L), DF es volumen de dilución, MW es el peso molecular de las betalaínas (550 g/mol), ϵ es el coeficiente de extinción de betalaínas (65,000 L/mol cm), L es la longitud de la celda (1 cm), W es el peso de la muestra (0.9987 g/mL)

La estabilidad de las betalaínas se evaluó de acuerdo con lo descrito por Fernández-López y col. (2013), la determinación se realizó cada 24 h durante 72 h, para ello la muestra se diluyó en agua (1:10) y se realizó un barrido de 350 a 650 nm. La estabilidad (%R) se obtuvo mediante la Ecuación (2).

$$\% R = \frac{\text{mg de betalaína tiempo } x}{\text{mg betalaína tiempo } 0} \quad (2)$$

5.3 Colorimetría de las betalaínas

La prueba de colorimetría se realizó siguiendo el método descrito por Zhang y col. (2022) con modificaciones. Se midió el pH de la solución de pigmentos en potenciómetro (PHS-3CU, Yueping, Shanghai) para establecer el pH inicial de la solución. Posteriormente, se añadió hidróxido de sodio y ácido clorhídrico de manera tal que se contara con la escala completa de pH. Se observó los cambios de color de acuerdo con el pH.

5.4 Actividad antimicrobiana de betalaínas ante *L. innocua* y *S. enterica*

La actividad antimicrobiana de la betalaína se evaluó de acuerdo con lo propuesto por Pérez (2016) con algunas modificaciones. Se realizaron cinéticas de crecimiento para *L. innocua* y *S. enterica* en caldo Listeria y soya tripticaseína respectivamente. Se colocó un inóculo de 10^6 UFC/mL y se midió la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Genesys 10, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), las lecturas se realizaron cada hora hasta alcanzar fase estacionaria. Durante la cinética, la incubación se realizó en un agitador orbital (MaxQ 6000, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a 120 rpm y 30 °C.

La actividad antimicrobiana de las betalaínas ante *L. innocua* y *S. enterica* se analizó como se describió anteriormente, adicionando el pigmento a diferentes concentraciones 1-5%, 10%, 20%, 30 %, 40% y 50% (v/v). Una vez determinada la MIC (concentración mínima inhibitoria, por sus siglas en inglés), se evaluó el efecto de la adición de aceite esencial de romero en la actividad antimicrobiana de las betalaínas. El aceite de romero se evaluó de acuerdo con lo reportado por Escamilla-García y col. (2020) utilizando concentraciones de 0.5% y 1% (v/v). Los datos obtenidos de las cinéticas se analizaron de acuerdo con Olivares-Marin y col. (2018), con el programa Graphpad Prism 8.0. obteniendo los parámetros de tiempo de duplicación (Ecuación 3) y velocidad específica de crecimiento (Ecuación 4).

$$TD: \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3)$$

$$X_f = X_0 e^{\mu t} \quad (4)$$

donde TD es tiempo de duplicación, μ es velocidad específica de crecimiento, X_f es la concentración final de células, X_0 es la concentración inicial de células y t es el tiempo.

5.5 Elaboración de empaques

Se preparó una solución stock de cera de abeja siguiendo la metodología propuesta por Hagenmaier y Baker (1994). Se mezclaron 100 g de cera de abeja con 15 g de ácido esteárico, fundiendo a 60 °C. Se agregaron 15 g morfolina y 250 mL de agua en ebullición. Posteriormente, la solución de cera se enfrió con un baño de hielo, se filtró con una manta de cielo y la solución se expuso a 5 pulsos de 2000 V con periodos de descanso de 1 min usando un equipo de ultrasonido (Vibra-Cell VCX 500, Newton, CT, EUA).

Se elaboraron 4 tipos de empaques, uno a base de almidón, otro con quitosano, a partir de la mezcla de los dos, y una a partir de la mezcla con aceite esencial de romero. Estas soluciones fueron elaboradas siguiendo la metodología propuesta por

Escamilla-García y col. (2017) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de almidón (3% p/v) con 0.5% (v/v) de la solución de cera de abeja previamente preparada. Esto se calentó a 110 °C durante 2 h. Una vez cristalina la solución se añadió en una proporción 1:1 extracto de betabel, finalmente como plastificante se utilizó sorbitol (0.5 % p/v).

Se elaboró una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido láctico al 0.5% (v/v) y cera de abeja al 0.5% (v/v) y se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente (~25°C). Posteriormente se agregó extracto de betabel en una proporción 1:1 (v/v).

Finalmente, la mezcla se elaboró en un porcentaje (1:1) de las soluciones de almidón y quitosano descritas anteriormente, se adicionó sorbitol como plastificante a una concentración 0.5% (p/v) y cera de abeja 0.5% (v/v) con respecto al volumen final. A partir de la mezcla se obtuvieron dos muestras (con y sin aceite esencial de romero).

Con la finalidad de reducir la cantidad de burbujas en los empaques, las soluciones fueron desgasificadas. Una vez desgasificadas las soluciones, los empaques se elaboraron mediante el método de vaciado en caja, para ello se utilizaron moldes de silicón con un diámetro de 10.2 cm a los cuales se les adicionó 50 mL de cada solución. Posteriormente, se realizó un secado en horno (Felisa, San Juan de Ocotán Zapopan, Jalisco, México) a 40 °C.

5.6 Evaluación de cambios de color en los empaques

Los cambios de color de los empaques a diferentes valores de pH se evaluaron siguiendo la metodología por Kuswandi y col. (2020) con algunas modificaciones. Se elaboraron amortiguadores de pH a una escala de 1 a 10. Los empaques se pusieron en contacto con los diferentes amortiguadores durante 45 min. Con la finalidad de eliminar el excedente de líquido, los empaques se secaron durante 2 h a 40 °C. Finalmente se midieron los cambios de color a diferentes valores de pH utilizando un colorímetro (Vinckolor, China) registrando los parámetros L^* (luminosidad), a^*

(parámetro cromático rojo a verde), b^* (parámetro cromático amarillo a azul). Se calculó la diferencia total de color mediante la Ecuación 5.

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (5)$$

donde L_0^* , a_0^* y b_0^* son los parámetros del control

5.7 Caracterización del empaque inteligente

5.7.1 Caracterización física

5.7.1.1 Espesor del empaque

El espesor de los empaques se determinó con un micrómetro. Para ello se realizaron 5 mediciones por cada película en diferentes zonas, las cuales incluían los extremos y centro de cada una. El espesor se evaluó en 10 películas diferentes (Wahidin y col. 2021).

5.7.1.2 Solubilidad

La solubilidad en agua de los empaques se analizó siguiendo el método de Liu y col. (2020). Los empaques se cortaron en cuadrados (3 cm x 3 cm) y se llevaron a peso constante. Posteriormente, las muestras se colocaron en 50 mL de agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente (25 °C) con agitación constante en agitador de balanceo (SSM4, Stuart, Staffordshire, Reino Unido). Posteriormente, las soluciones con película se filtraron con papel filtro Whatman no. 4 y se secaron en un horno a 40 °C hasta peso constante. La solubilidad en agua se calculó mediante la Ecuación 6.

$$Ws (\%) = \frac{Wd - Wf}{Wd} * 100 \quad (6)$$

donde Ws es la solubilidad en agua, Wd es el peso inicial (g) y Wf es el peso final (g)

5.7.1.3 Permeabilidad a vapor de agua

La permeabilidad a vapor de agua se determinó siguiendo el método de la copa basado en ASTM E96-88 y ASTM E96-2 descrito por Gaona-Sánchez y col. (2015). La permeabilidad de los empaques se realizó cortando muestras de estas en forma circular con un diámetro aproximado de 3.9 cm, los empaques se mantuvieron a 30 °C y una humedad relativa de 100-0%, siendo el 100% el agua destilada dentro de la celda y 0% silica en el exterior de la celda, Se registró el peso cada 30 min utilizando una balanza analítica (Denver, Instrument, Goettingen, Alemania). La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó mediante la Ecuación 7:

$$WVP \left(\frac{g}{s \ m \ Pa} \right) = \frac{WVTR * L}{s * (\%RH_1 - \%RH_2)} \quad \text{Ecuación (7)}$$

donde $WVTR$ es el cociente de la pendiente de la curva cinética de pérdida de peso (g/s), s es por el área del empaque (m^2), $\%RH_1$ es el valor de HR dentro de la celda, $\%RH_2$ es el valor de HR fuera de la celda y L es el espesor del empaque (m).

5.7.1.4 Propiedades mecánicas

La fuerza de tensión y porcentaje de elongación de determinaron de acuerdo con lo propuesto por Ríos-de-Benito y col. (2021). Las propiedades mecánicas se evaluaron mediante un texturómetro (Brookfield, Mod, CT3, Middleborough, Massachussets, EUA). Se cortaron muestras de los empaques en tiras de 25 mm de ancho y 80 mm de largo y se colocaron entre dos abrazaderas con una separación inicial de agarre de 97.9 mm. La carga de activación fue de 4 N, una velocidad de 2 mm/s y una frecuencia de muestreo de 10 puntos/s.

5.7.2 Microestructura

5.7.2.1 Microscopía electrónica de barrido

Se siguió el método de Ruiz-Gómez y col. (2021). Se observaron los empaques con pigmentos usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) JEOL JSM-7600F. Los empaques se cortaron y se fijaron en cinta de carbón y se colocaron directamente sobre un portamuestras de aluminio.

Posteriormente, se pasaron a examinar los empaques con un voltaje de 1 kV con una amplificación de 60-10000x.

5.7.2.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se siguió el método descrito por Escamilla-García y col. (2022). Las características topográficas de las películas se determinaron utilizando un microscopio de fuerza atómica (Park NX10, Corea). Se aplicó el método de no contacto y se utilizó una punta de silicona recubierta de aluminio PPP-NCHR (Nanosensors, Suiza) con una frecuencia de resonancia de 330 kHz y una constante de resorte de 42 N m^{-1} . Se analizaron muestras de $0.5 \times 0.5 \text{ cm}$ y se escanearon tres áreas de $20 \times 20 \mu\text{m}$ a una velocidad de 1 Hz con una resolución de 525×525 píxeles. El análisis de imagen y los parámetros de rugosidad R_a y R_q fueron obtenidos mediante el programa SmartAnalysis (Instituto Checo de Metrología, CZE).

5.7.3 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis de las interacciones de los componentes de los empaques se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo aplicando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Nicolet 6700) en un rango de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ con 32 barridos. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Spectragryph 1.2 (Rodríguez-González y col., 2018).

5.7.4 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los empaques se evaluó mediante halos de inhibición siguiendo el método de Hernández-Hernández y col. (2014). Para ello se utilizaron círculos de cada uno de los empaques con un diámetro aproximadamente de 0.7 mm, los cuales se esterilizaron previamente mediante exposición a luz UV durante 15 min. Los empaques se colocaron en agar soya tripticaseína para *S. enterica* y agar *Listeria* para *L. innocua* previamente inoculados, los medios se incubaron a 37°C durante 48h

en incubadora (Fe-132AD, Felisa, México). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la presencia o ausencia de halo de inhibición.

5.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, California, EUA). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia $p < 0.01$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de betalaínas

En la Figura 2 se presenta el barrido realizado al extracto obtenido mediante espectroscopia UV-VIS, en el cual se observan dos puntos máximos, uno a 477.9 nm y otro 533.7 nm. Los máximos de absorción observados son característicos de dos tipos diferentes de betalaínas, el primero representa a las betaxantinas mientras que el segundo a las betacianinas los cuales son responsables de los colores rojo-violeta (betacianinas) y amarillo-naranja (betaxantinas) presentes en algunas plantas, flores y vegetales. Algunos estudios han reportado resultados similares obteniendo máximos de absorción para las betacianinas y las betaxantinas a los 535 nm y 480 nm respectivamente (Vargas, 2020; Nouairi y col., 2021).

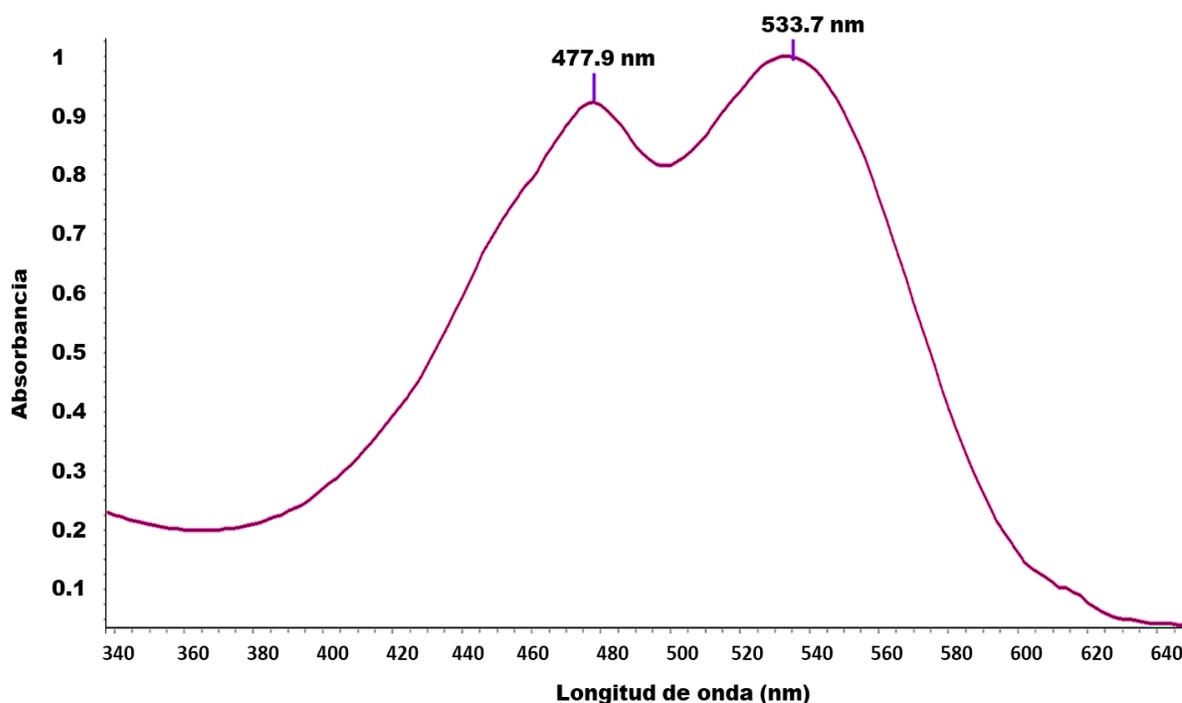


Figura 2. Espectro de absorción de barrido de extracto de betabel.

El contenido de betalaínas (mg/g) en un periodo de 72 h se muestra en el Cuadro 3, donde se observa una disminución significativa en el contenido de betalaínas a partir de las 24 h. El contenido inicial de betalaínas obtenido fue de 0.82 ± 0.04 mg/g disminuyendo hasta 0.04 ± 0.008 mg/g, por lo que se presenta una alta degradación

del pigmento. Esto se relaciona directamente con el porcentaje de color calculado, el cual disminuyó en aproximadamente un 91.42%. La disminución en el contenido de las betalaínas puede deberse a la degradación de éstas. Algunos estudios han reportado que en un medio acuoso su estabilidad disminuye debido a la hidrólisis del enlace aldimina. La hidrólisis del enlace aldimina consiste en la ruptura de un enlace C=N formado entre un aldehído y amina promovido por la presencia de agua (Herbach y col., 2006; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021).

Cuadro 3. Contenido total de betalaínas y estabilidad durante 72 h.

Tiempo (h)	Contenido de betalaínas (mg/g)	Color restante (%)
0	0.82 ± 0.04 ^a	
24	0.49 ± 0.05 ^b	60.70 ± 8.61 ^a
48	0.08 ± 0.003 ^c	9.71 ± 0.61 ^b
72	0.04 ± 0.008 ^d	5.21 ± 1.11 ^c

^{a-d} Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p > 0.01$).

La concentración de betalaínas obtenida es similar a lo reportado por otros autores. Kaur y col. (2022) obtuvieron a partir de la pulpa de betabel una concentración de 0.676 mg/g. Abdo y col. (2020) realizaron la extracción de betalaínas a partir de la cáscara de betabel utilizando como solvente metanol, obteniendo una concentración de 0.81 mg/g, mientras que de hojas y pulpa de betabel en etanol el contenido de betalaínas que se extrajo fue de 0.48 mg/g y 0.81 mg/g respectivamente. Otros autores han obtenido un mayor rendimiento en la extracción de betalaínas (2.49 mg/g) utilizando etanol 50% (v/v) (Righi y col. 2018) o aplicando un pretratamiento de radiación gamma con una dosis máxima de 10 gray (1.36 mg/g) (Kottaridis, 2020).

Sin embargo, algunos autores han reportado que la extracción de betalaínas con ácido cítrico o ascórbico brinda una mayor estabilidad a estos pigmentos ya que reducen la actividad de enzimas tales como, polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa

(POD), además reducen la degradación causada por la exposición a la luz (Nirmal y col. 2021; Sigwela, 2021).

En la Figura 3 se muestran los cambios de color de las betalaínas obtenidas a los diferentes tiempos de anaquel (0, 24, 48 y 72 h), así como los espectros de absorción obtenidos en el mismo periodo de tiempo. Debido a la alta concentración de la muestra de betabel, se realizó una dilución 10^{-1} . De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que a las 24 h se tiene un desplazamiento hipocrómico (decremento de absorbancia) respecto a la muestra a las 0 h, indicando una disminución en concentración cambiando de un rosa intenso a un rosa claro. A las 48 y 72 h presentan un desplazamiento hipsocrómico (desplazamiento al azul) respecto a la 0 h con un cambio visible hacia naranja y amarillo, respectivamente.

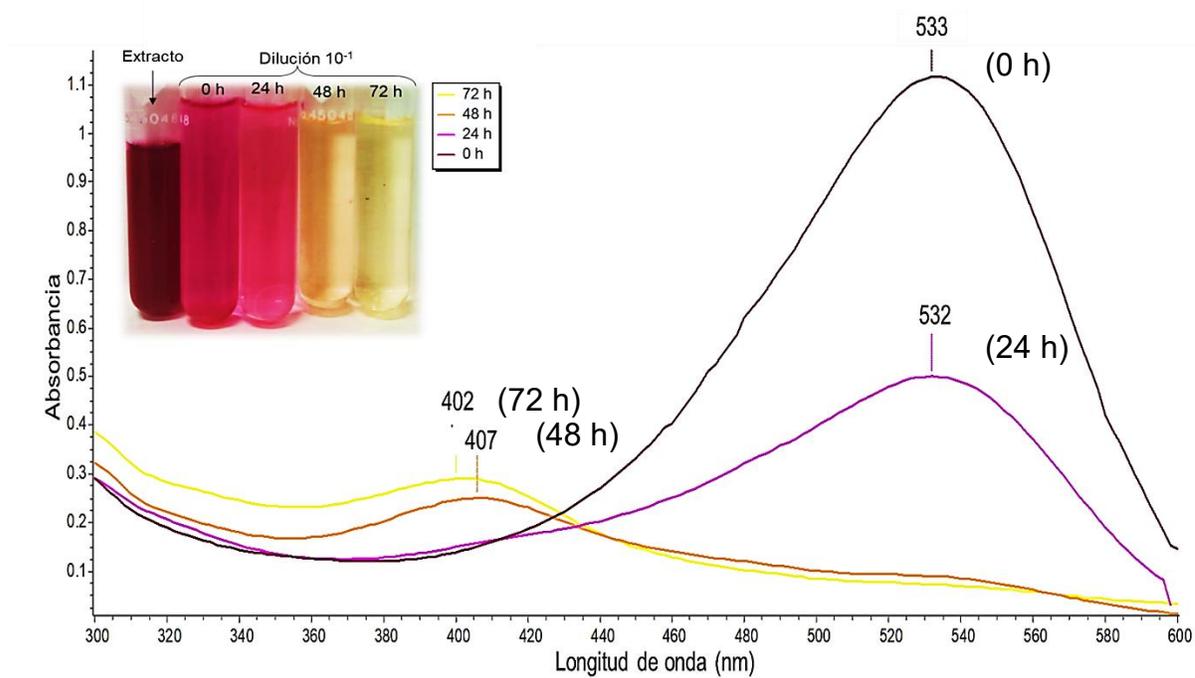


Figura 3. Espectro de absorción de extracto de betalaínas durante 72 h.

Las muestras de las 0 y 24 h presentaron un máximo de absorción a los 533 y 532 nm respectivamente indicativo de la presencia de betacianinas, presentando una mayor absorbancia a las 0h. Esto se puede observar en los colores del extracto, que

al presentar betacianinas, estas muestras presentan color rojizo siendo más intenso en la muestra de las 0h. En cambio, los extractos de las 48 y 72 h presentan máximos de absorción a los 407 y 402 nm los cuales son característicos de las betaxantinas y del color amarillo (Dumbravă y col., 2012).

Este cambio de color ocurre debido a que se lleva a cabo una descarboxilación de betanina e isobetanina en C17. Por otra parte, la coloración amarilla obtenida a las 72 h se debe a la deshidrogenación de betanina e isobetanina (Herbach y col., 2004). Resultados similares fueron reportados por Aztatzi-Ruggerio y col. (2019) quienes evaluaron el porcentaje de color restante de las betalaínas tras un tratamiento térmico a 75 °C y encontraron que después de 120 min sólo se conservó el 55% de color.

6.2. Efecto de pH en las betalaínas

El efecto del pH en el color de las betalaínas se evaluó en las diferentes matrices que se utilizarán para la elaboración de los empaques (Figura 4). En la Figura 4A se presenta el extracto de betalaínas en ácido cítrico, donde se observa que en medio ácido (pH 1 a 6) presenta colores rojizos, mientras que a pH 7 a 9 se observan soluciones en diferentes escalas de morado y finalmente en medios básicos se ven tonalidades de naranja (pH10) a amarillo (pH 11-12). La solución de betalaínas en almidón (Figura 4B) presenta el mismo patrón de cambio de color, sin embargo, se puede apreciar que la intensidad de color es menor. Las betalaínas en quitosano (Figura 4C) y la mezcla almidón quitosano (Figura 4D) se puede observar que a pH de 1 a 3 se presentan colores de amarillo a naranja cambiando a tonos rojizos en un pH de 4 a 7, morados entre pH de 8 a 10 y finalmente amarillo nuevamente a pH de 11 y 12. Estas diferencias de color indican que existe una interacción entre los compuestos de las diferentes matrices y las betalaínas influyendo de manera diferente para la síntesis de betacianinas o de betaxantinas. De acuerdo con lo reportado por (Nakatsuka y col., 2013), la betacianina se forma a partir de la conversión de tirosina dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por procesos enzimáticos o espontáneos. Si se lleva a cabo una glicosilación favorece la formación de betacianinas que generan color rojo-violeta. Por otra parte si el ácido betalámico se

conjuga con algún aminoácido o amina forma betaxantinas responsables del color amarillo-naranja. Es por lo que en soluciones con quitosano al tener un punto isoeléctrico en un pH entre 6 y 7 y quedar con carga positiva en medios ácidos y con carga negativa en medios alcalinos, favorece la interacción de los grupos amina con las betalaínas prevaleciendo el color amarillo (Xu y col., 2010). El color rojo de las soluciones sin quitosano prevalece en una escala mayor de pH debido a que las betalaínas son estables en un rango de pH de 3-6 (coloración roja), en condiciones alcalinas ocurre una hidrólisis del enlace aldimina generando coloraciones amarillas, mientras que la acidificación produce recondensación del ácido betalámico con un grupo amino produciendo un color violeta (Jadhav y col. 2020).

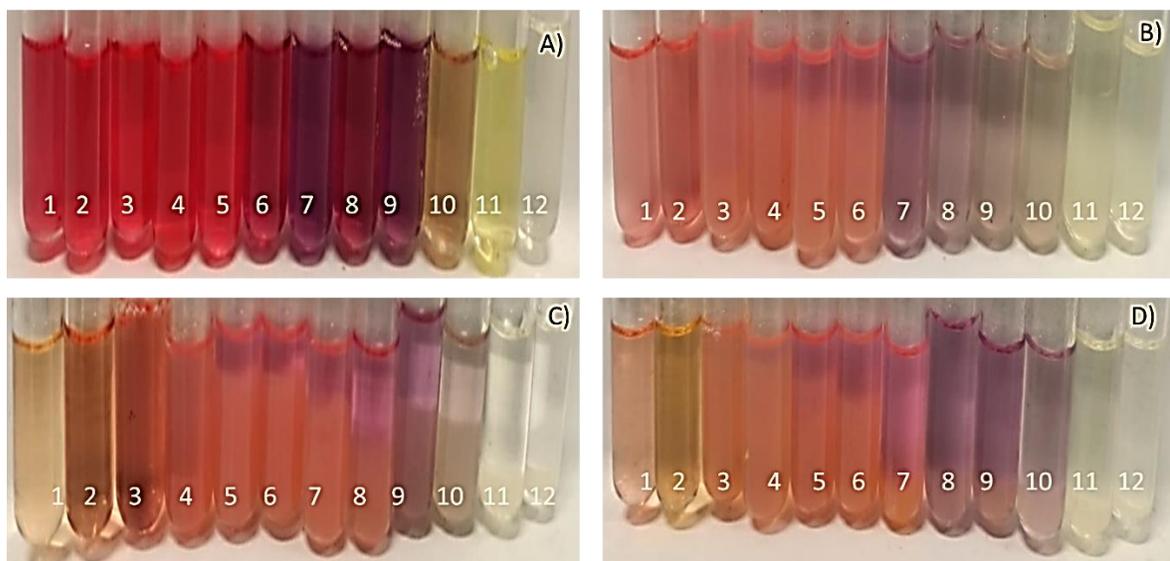


Figura 4. Cambio de color de las betalaínas en solución de película a diferentes valores de pH. A) betalaínas en ácido cítrico al 2%, B) solución de película (almidón), C) solución de película (quitosano), D) solución de película (almidón-quitosano)

6.3. Curvas de crecimiento y determinación de parámetros cinéticos

6.3.1. Actividad antimicrobiana de las betalaínas

Se evaluó el efecto de las betalaínas ante *L. innocua* y *S. enterica* mediante curvas de crecimiento (Figura 5). Se puede observar que las betalaínas tienen actividad antimicrobiana ante *L. innocua* a partir de 2% (Figura 5A). En cambio, se observa que

el efecto antimicrobiano ante *S. enterica* no es efectivo a esta concentración, presentando a un 20% de betalaínas un efecto bacteriostático y a 50% un efecto bactericida (Figura 5B).

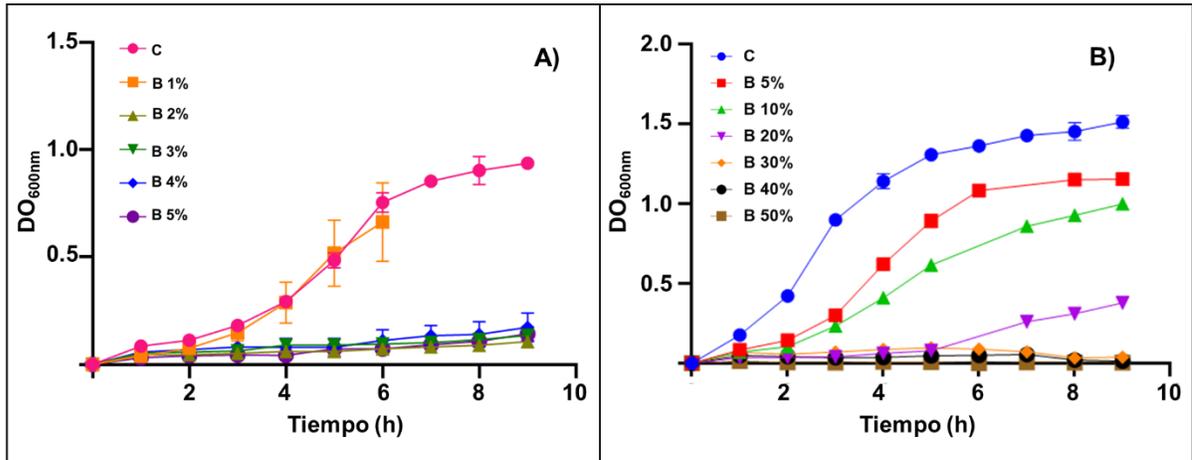


Figura 5. Curva de crecimiento en presencia de betalaínas. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. DO_{600 nm}: densidad óptica a 600 nm; C: control; B: betalaína.

La velocidad específica de crecimiento de *L. innocua* disminuyó significativamente en una concentración de 2% de betalaínas (Figura 6A). En cambio, para *S. enterica* (Figura 6B), se observa que la velocidad específica requirió de una mayor concentración, inhibiendo totalmente a una concentración del 50% de betalaínas (Figura 6).

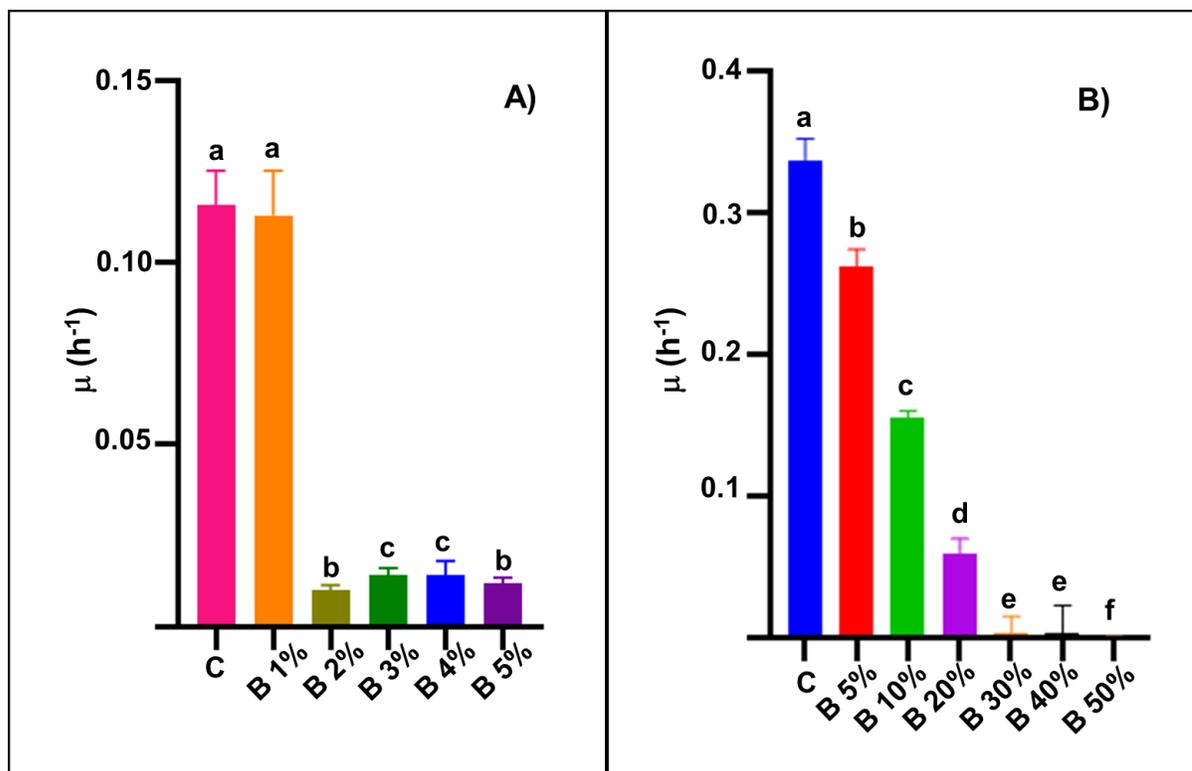


Figura 6. Velocidad específica de crecimiento en presencia de betalaínas. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. μ : velocidad específica de crecimiento; C: Control; B: Betalaína. Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p > 0.001$)

El efecto de las betalaínas en el tiempo de duplicación (TD) de *L. innocua* y *S. enterica* se observa en la Figura 7. El TD de *L. innocua* (Figura 7A) aumenta significativamente a partir de la concentración de 2% de betalaínas, aumentando 2.5 veces en comparación a un medio sin betalaínas. Por otra parte, para aumentar al doble el TD de *S. enterica* (Figura 7B) se requirió una concentración de 20%, mientras que con un 50% de betalaínas el TD fue de 9.45 ± 0.01 h. De los resultados obtenidos se puede observar que se requiere de mayor concentración de betalaínas para inhibir a *S. enterica*, en comparación a *L. innocua*. Estos resultados son similares a lo descrito por Tenore y col. (2012) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de betalaínas provenientes de pitaya, obteniendo que para bacterias Gram negativas se requiere una MIC mayor (15.6-62.5 mg/mL) en comparación a Gram positivas (7.8 mg/mL). Por otro lado, Čanadanović-Brunet y col. (2020) reportaron que el extracto de betabel

disminuyó el crecimiento de las Gram negativas, no obstante, no presentó actividad bactericida.

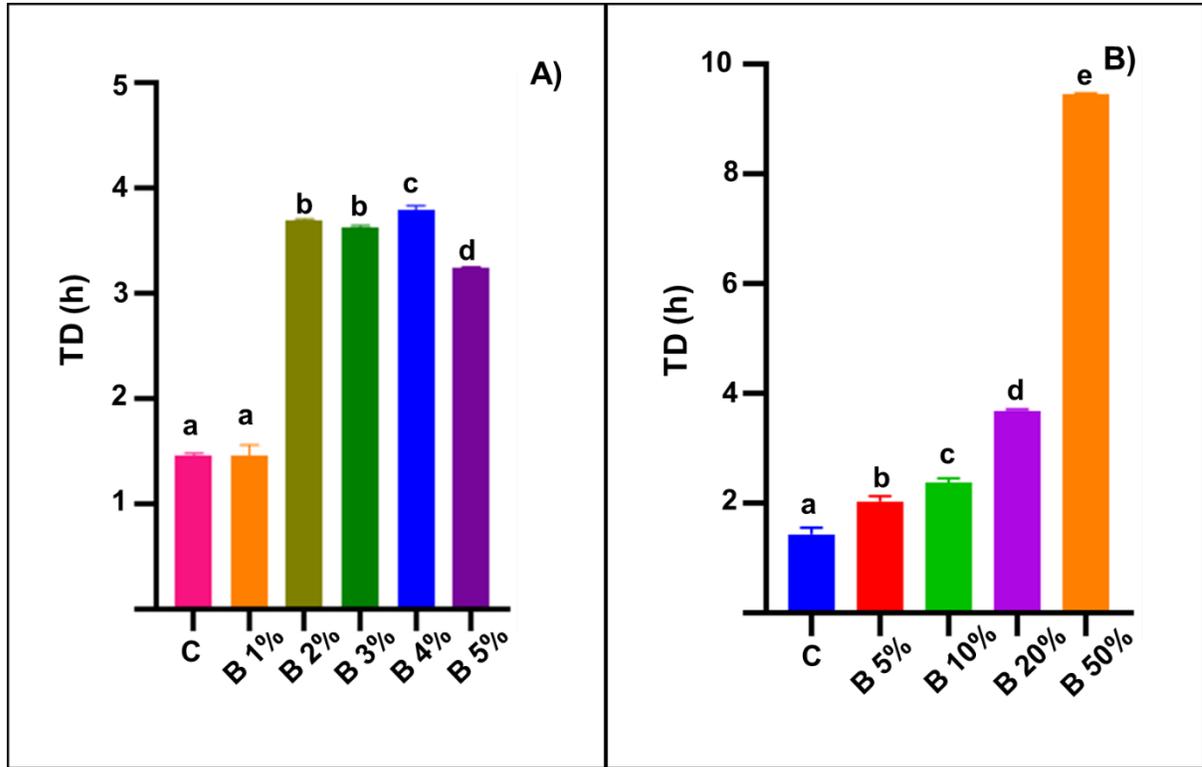


Figura 7. Tiempo de duplicación en presencia de betalaínas. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Td: tiempo de duplicación; C: control; B: betalaína.

La actividad antimicrobiana de las betalaínas no ha sido descrita, sin embargo, ésta se ha atribuido a la despolarización de la membrana, fuga de citoplasma, disminución del pH intracelular bacteriano, pérdida de contenido de proteínas y daño en el ADN (Guo y col., 2020). Por lo que, la actividad antimicrobiana observada en el presente trabajo se puede deber a la composición estructural de bacterias Gram positivas (*L. innocua*) y negativas (*S. enterica*). Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa compuesta por lípidos y peptidoglicano que forman una barrera selectiva que no permite que el antimicrobiano penetre y dañe la membrana interna (Yap y col., 2021). Además, la membrana externa al ser hidrofóbica confiere aún más resistencia ante las betalaínas, las cuales son hidrofílicas (Khan y col. 2022).

6.3.2. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de romero

Se evaluó la actividad antimicrobiana de aceite esencial de romero ante *L. innocua* y *S. enterica* (Figura 8). Se puede observar que el aceite esencial de romero tiene un efecto bactericida ante *L. innocua* (Figura 8A) y *S. enterica* (Figura 8B).

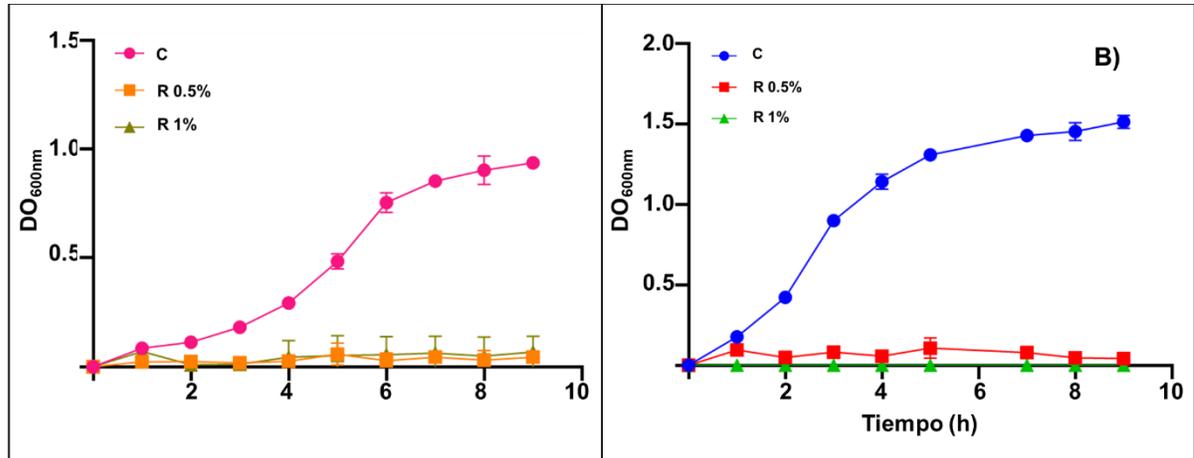


Figura 8. Curva de crecimiento en presencia de aceite esencial de romero. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. DO_{600 nm}: densidad óptica a 600 nm; C: control; R: aceite esencial de romero.

La velocidad específica de crecimiento se evaluó en presencia del aceite esencial de romero. De los resultados obtenidos, se observa una disminución significativa en concentraciones de 0.5 y 1% de aceite esencial de romero con ambos microorganismos en comparación al control como se muestra en la Figura 9. *L. innocua* (Figura 9A) presentó una disminución en la velocidad específica aproximadamente 23 veces en comparación al control utilizando una concentración de R 0.5%. En la Figura 9b se observa una mayor inhibición de *S. enterica* con la misma concentración de R disminuyendo 51 veces la del control.

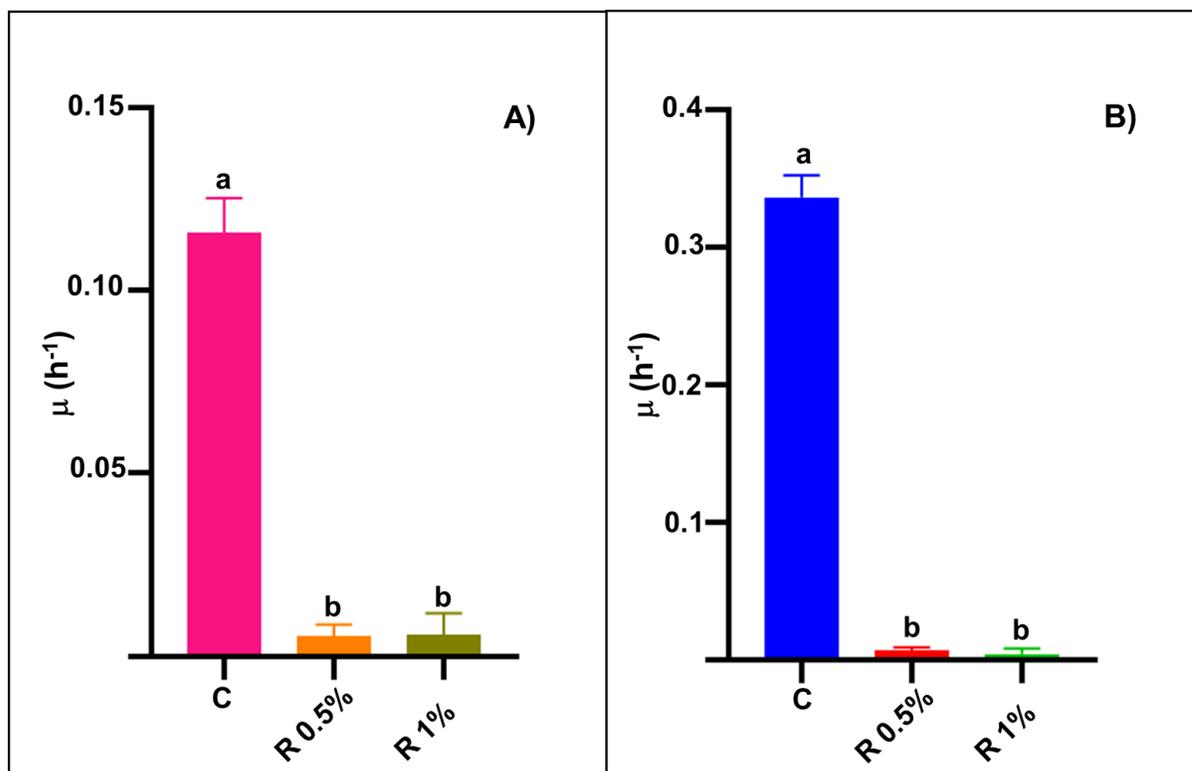


Figura 9. Velocidad específica de crecimiento en presencia de aceite esencial de romero. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica typhimurium*. μ : velocidad específica de crecimiento; C: Control; R: aceite esencial de romero. Valores con letras iguales en la misma columna, no representa diferencia significativa ($p > 0.001$)

En la Figura 10 se presenta el efecto del aceite esencial de romero en el TD de *L. innocua* (Figura 10A) y *S. enterica* (Figura 10B). De los resultados obtenidos se puede observar que el TD de *L. innocua* aumentó de 1.45 ± 0.03 h hasta 3.63 ± 0.03 h en presencia del aceite de romero, mientras que para *S. enterica* este parámetro aumentó de 1.43 ± 0.11 h (control) hasta 7.02 ± 0.06 h (R 1%).

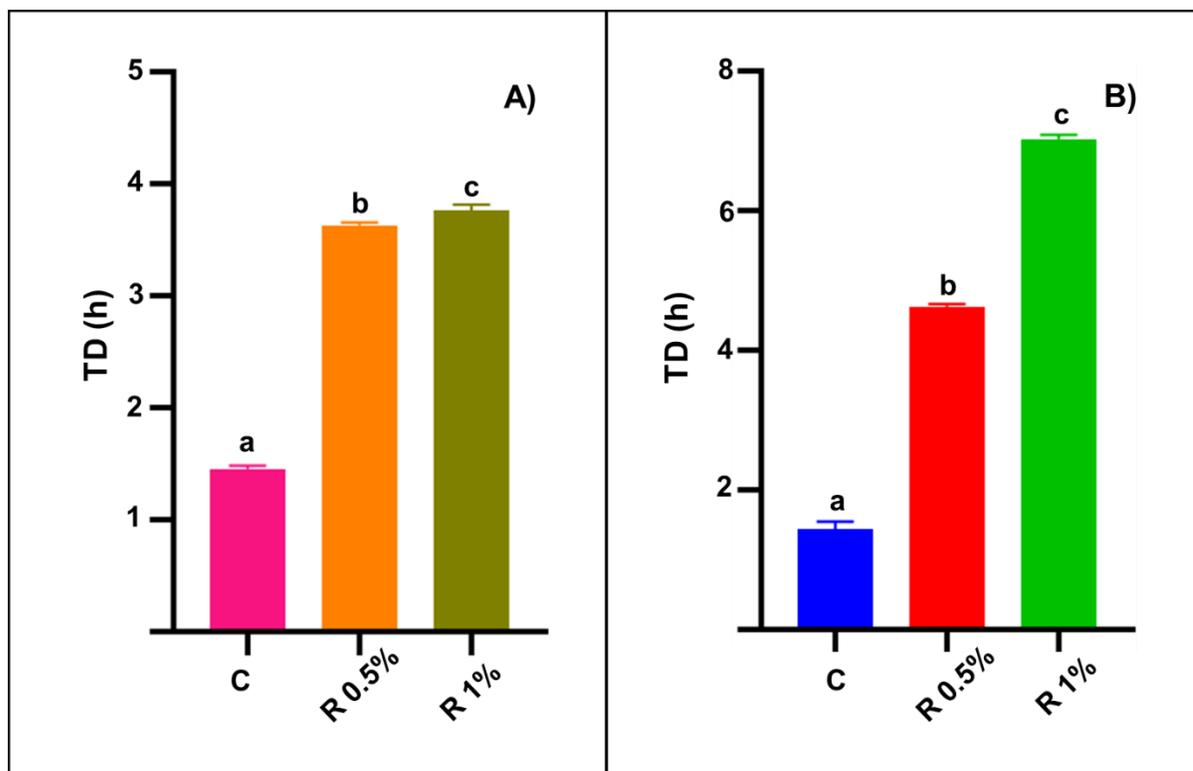


Figura 10. Tiempo de duplicación en presencia aceite esencial de romero. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. TD: tiempo de duplicación; C: control; R: aceite esencial de romero.

De acuerdo a lo reportado por Suvarna y col. (2022), los componentes bioactivos de los aceites esenciales se adhieren a la superficie celular, los cuales entran a la bicapa de fosfolípidos de la membrana alterando la permeabilidad y causando muerte celular por pérdida de componentes intracelulares (proteínas, ATP, ADN y electrolitos). Sin embargo, el mecanismo de acción es específico para cada aceite esencial y cada microorganismo. Jiang y col. (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero ante bacterias Gram positivas y Gram negativas, obteniendo una MIC entre 0.03-0.3% la cual depende del microorganismo de estudio. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) requirió tan solo 0.03%, mientras que *Escherichia coli* (Gram negativa) requirió la mayor MIC de 0.3%.

6.3.3. Actividad antimicrobiana de betalaínas y aceite esencial

Para evaluar el efecto de las betalaínas (sinérgico o antagónico) en presencia del aceite esencial de romero, se realizaron cinéticas de crecimiento (Figura 11). Para esto se utilizó la MIC obtenida de R y la MIC obtenida de betalaínas para *L. innocua* y *S. enterica*. En la Figura 11A se observa las cinéticas de *L. innocua* en donde se observa inhibición en las dos concentraciones de betalaínas con R (0.5%), un comportamiento similar se presenta en la cinética de *S. enterica* (Figura 11B). En base a los resultados observados la mezcla de betalaínas y aceite esencial de romero muestra un efecto sinérgico.

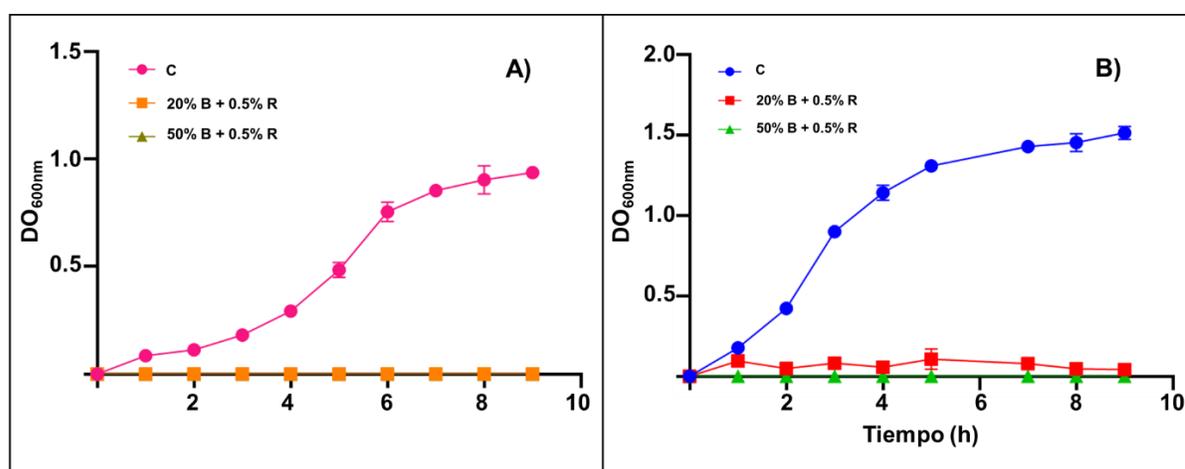


Figura 11. Curva de crecimiento en presencia de betalaínas y aceite esencial de romero. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. DO_{600 nm}: densidad óptica a 600 nm; C: control; B: betalaína; R: aceite esencial de romero.

En la Figura 12 se presenta el efecto de las betalaínas y el R en la velocidad específica de crecimiento de *L. innocua* y *S. enterica*. Para el caso de *L. innocua* (Figura 12A), los valores de velocidad específica de crecimiento fueron de 0 h⁻¹, sin presentar diferencia significativa al utilizar una concentración de 20 % y 50 % de betalaínas. La concentración de betalaínas ante *S. enterica* (Figura 12A) sí presentó diferencia significativa, sin embargo, en ambos casos se observa una disminución significativa de este parámetro en comparación al control. La concentración de betalaínas al 50% inhibió en su totalidad a *S. enterica* mientras que con un 20% de betalaínas se obtuvo una velocidad específica de a 0.01±0.00 h⁻¹.

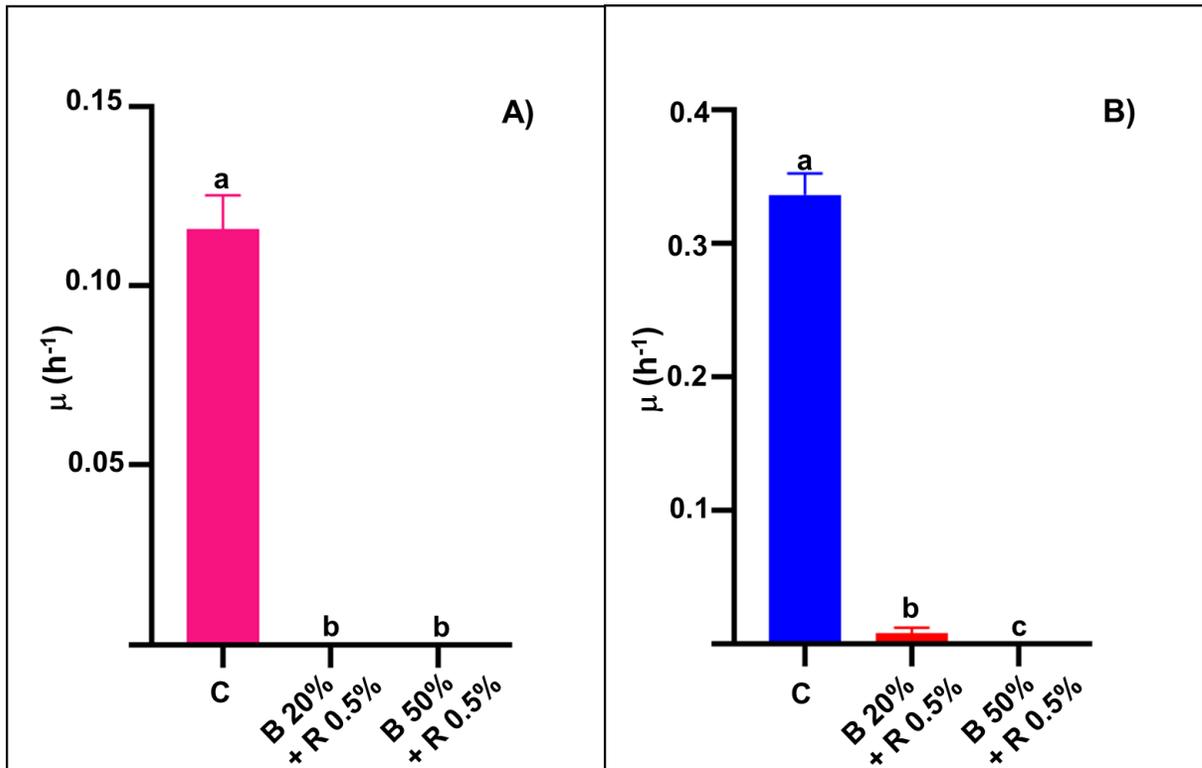


Figura 12. Velocidad de crecimiento específica en presencia de betalaínas y aceite esencial de romero. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. TD: tiempo de duplicación; C: control; B: betalaína; R: aceite esencial de romero.

El tiempo de duplicación para la mezcla betalaínas y aceite esencial de romero se muestra en la Figura 13. El TD de *L. innocua* (Figura 13 A) presentó un aumento de aproximadamente 14 veces más en comparación al control sin presentar diferencia significativa a las diferentes concentraciones de betalaínas. De los resultados obtenidos de *S. enterica*, se observa un aumento en el TD con las dos concentraciones de betalaínas utilizadas, siendo de 4.62 ± 0.03 h y 7.02 ± 0.06 h para la betalaínas al 20 % y 50% respectivamente, ambas con 0.5% de R.

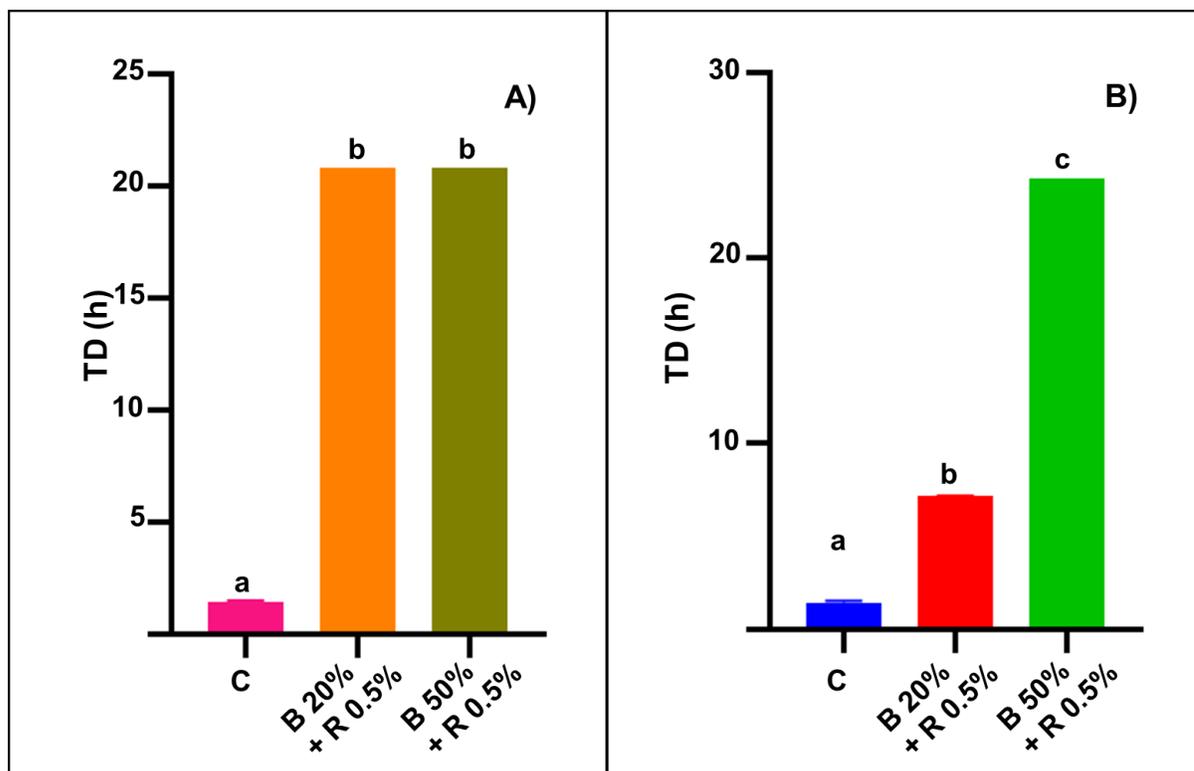


Figura 13. Tiempo de duplicación en presencia de betalaínas y aceite esencial de romero. A) *Listeria innocua*; B) *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. TD: tiempo de duplicación; C: control; B: betalaína; R: aceite esencial de romero.

Debido a la estructura de los aceites esenciales al mezclarse con otros compuestos tales como los antioxidantes (betalaínas), estos pueden actuar sinérgicamente. Estas interacciones pueden afectar múltiples procesos bioquímicos en las bacterias reforzando así el efecto antimicrobiano (Sharma y col., 2020); además, en presencia de antioxidantes la actividad antimicrobiana se prolonga durante un mayor tiempo al evitar la oxidación de los aceites (Basavegowda & Baek, 2021).

6.4. Elaboración de empaques

En el Cuadro 4 se muestra el peso de cada una de las películas, así como el contenido de betalaínas por gramo de película, en donde se observa que la película con mayor peso ($2.31 \pm 0.03\text{g}$) y concentración de betalaína ($1.89 \pm 0.03 \text{ mg/g}$) es la película de

almidón, siendo la de quitosano la que presenta los valores más bajos en ambos parámetros.

Cuadro 4. Contenido de betalaínas por gramo de película

Película	Peso de la película (g)	Contenido de betalaínas (mg betalaína/ g película)
A	2.31 ± 0.03 ^a	1.89 ± 0.03 ^a
Q	1.61 ± 0.05 ^b	1.32 ± 0.04 ^b
AQ	1.90 ± 0.06 ^c	1.56 ± 0.05 ^c
AQ+R	2.04 ± 0.02 ^d	1.67 ± 0.02 ^d

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar. Q: Quitosano; A: Almidón; R: Aceite esencial de romero. ^{a-d} Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p > 0.001$)

Una posible causa en las diferencias en el espesor de la película, es por la capacidad de retención de agua del almidón, algunos autores han reportado que debido al poder de hinchamiento de los almidones se obtienen películas con espesores altos (Santacruz y col., 2015).

La Figura 14 muestra las películas de almidón, quitosano, almidón-quitosano y almidón-quitosano-aceite y sus respectivos parámetros de color (L^* , a^* , b^* y ΔE). En los resultados se observa que la película de almidón es morada, mientras que la de quitosano y la mezcla quitosano-almidón son rojas y al añadir aceite esencial de romero, la película cambia a naranja. Dependiendo de la matriz de la película, los parámetros de color cambian. Las películas de A, Q y AQ no presentan diferencia significativa en el parámetro de a^* el cual indica el color rojo de las películas, sin embargo, presentan diferencia significativa en el parámetro b^* (azul a amarillo) presentando el valor más alto la película de Q (50.04 ± 5.85) mientras que el valor más pequeño lo presentó la película de A (10.63 ± 3.10). La película A al presentar el valor más bajo de b^* que, si bien está dentro del rango de amarillo, es la película

que más se acerca al azul, dando la combinación de rojo y azul un color morado como se muestra en la Figura 14.

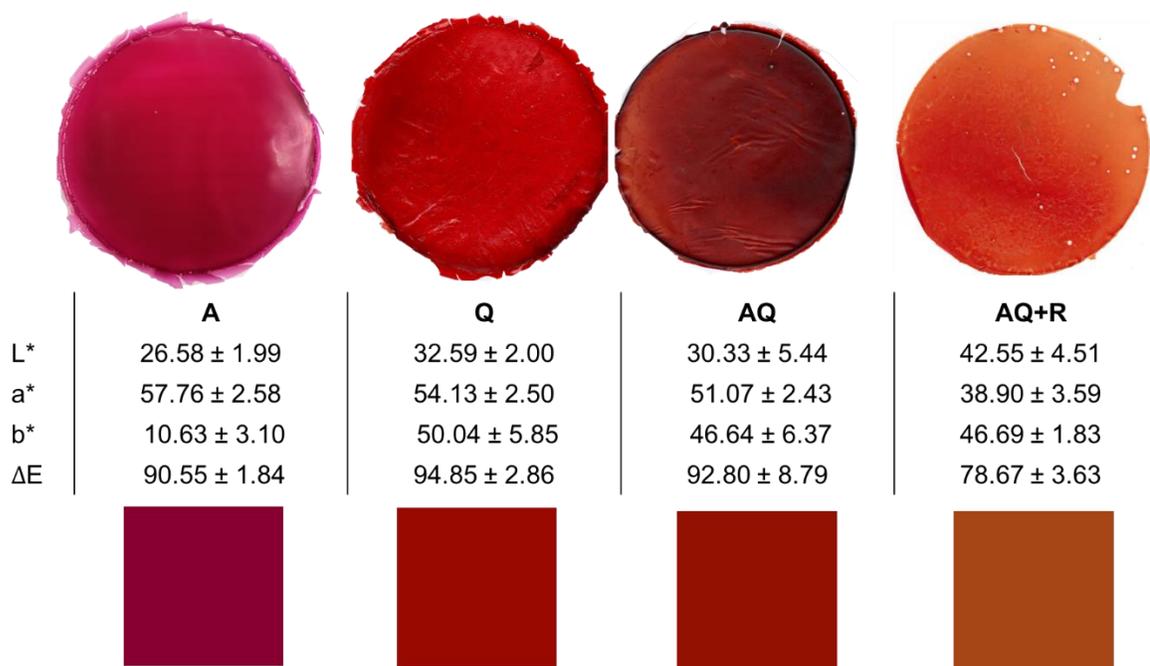


Figura 14. Color de películas comestibles y sus parámetros de color. A: almidón; Q: Quitosano; R: Aceite esencial de romero; L*: Luminosidad; a*: parámetro de color de verde a rojo; b*: parámetro de color de azul a amarillo; ΔE: diferencia total de color. Valores con letras iguales en la misma columna, no representa diferencia significativa ($p > 0.001$).

6.5. Efecto de pH en el color de los empaques

En la Figura 15 se presenta el cambio de color de las betalaínas a diferentes pH, se puede observar que el empaque presentó color café en pH 1 y pH 8, mientras que en pH 2 se tornó a morado. La luminosidad de las betalaínas no presentó diferencia por efecto de pH. El parámetro en el que se observa un mayor cambio es en b*. De acuerdo con lo reportado por Esquivel (2016) los cambios de color de las betalaínas se deben a su estructura. Las betalaínas contienen betaninas y vulgaxantinas. Las betaninas son un tipo de betacianinas, las cuales en su estructura en R tiene β-glucosa y en R' hidrógeno, las vulgaxantinas son un tipo de betaxantinas que en R tiene hidrógeno y en R' tiene glutamina. Estos grupos son los que permiten los cambios de color a través de reacciones como desglicosilación.

Como se mencionó anteriormente, los principales cambios de color de las betalaínas se observan a los pH 1 (café), pH 2 (violeta) y pH 8 (café rojizo). En pH 2, se obtuvo un valor de b^* negativo (tiende hacia azul) por lo que se puede observar un color violeta que se ha relacionado con desglucosilación. En condiciones muy ácidas o en presencia de β -glucosidasa, la glucosa de betanina se puede escindir lo que provoca un desplazamiento batocrómico de 4 nm. La aglicona que queda en lugar de la glucosa, es mucho menos estable, lo que la hace más susceptible a la oxidación, como se observa para el pH 1 (Herbach y col., 2006).

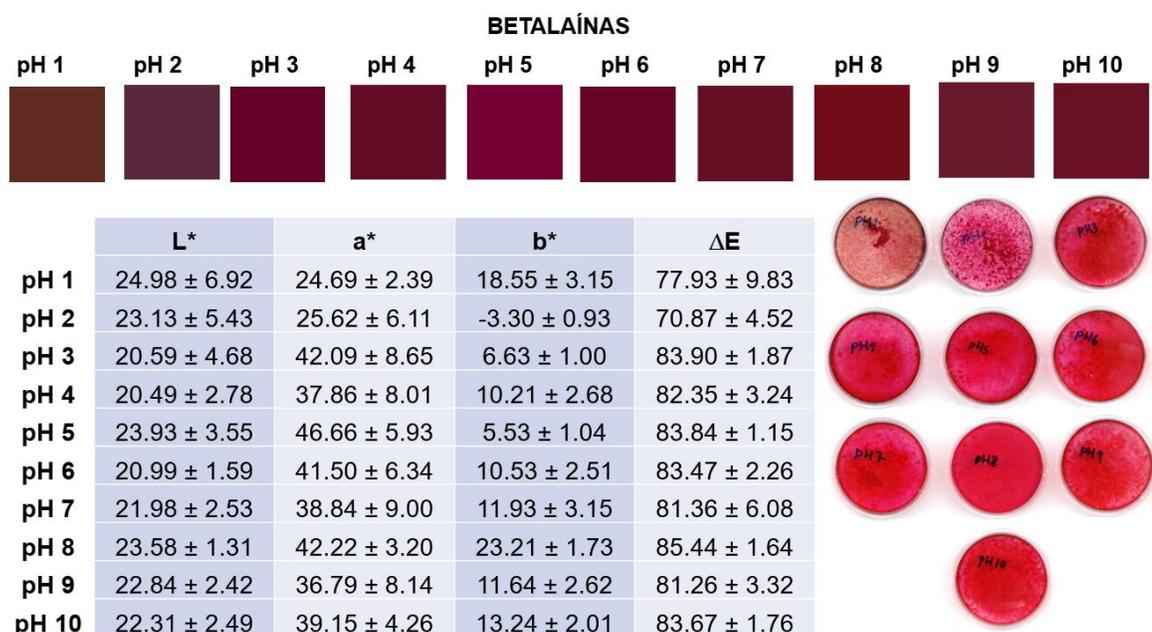


Figura 15. Efecto del pH en el cambio de color de betalaínas. L*: Luminosidad; a*: parámetro de color de verde a rojo; b*: parámetro de color de azul a amarillo; ΔE: diferencia total de color.

El efecto del pH en los empaques elaborados a base de almidón se muestra en la Figura 16, donde se observa que película de almidón presenta un color violeta en pH 1 (valor de b^* más bajo, por lo que tiende hacia azul), mientras que en el resto de la escala de pH se muestran de color rosado. El empaque no presenta diferencia en los parámetros L^* y b^* a partir del pH de 2 hasta 10. El parámetro b^* , presenta diferencias en toda la escala de pH evaluada, sin embargo, en todos los casos los empaques tienden al color azul. El color violeta a pH 1 se atribuye a la desglucosilación, sin

embargo, no se llega al punto de oxidación (color marrón) como fue el caso de las betalaínas. Esto se puede deber a la estabilidad de la aglicona dentro de la matriz de la película.

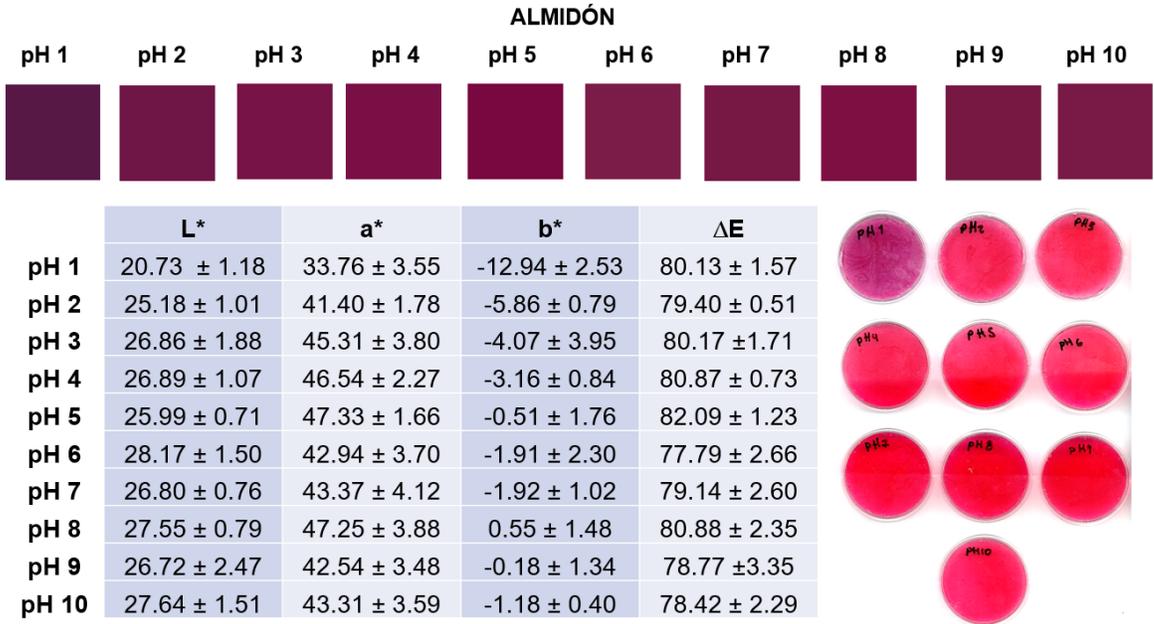


Figura 16. Efecto del pH en el cambio de color del empaque de almidón con betalaínas. L*: Luminosidad; a*: parámetro de color de verde a rojo; b*: parámetro de color de azul a amarillo; ΔE : diferencia total de color.

El empaque elaborado a base de quitosano presentó cambios significativos en pH 1 y pH 8 (Figura 17), tornándose marrones (valores de a* bajos). El resto de las películas se mantuvieron rojas. De acuerdo con los parámetros obtenidos a estos valores de pH se obtuvieron diferencias en L*, a*, b* y ΔE .

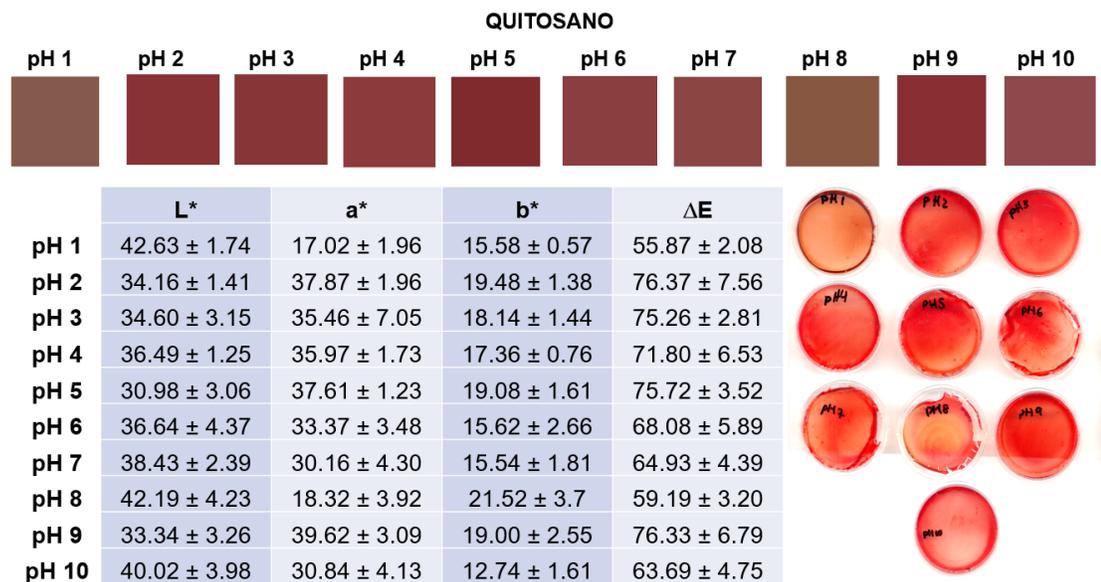


Figura 17. Efecto de pH en los cambios de color del empaque a base de quitosano con betalaínas. L*: Luminosidad; a*: parámetro de color de verde a rojo; b*: parámetro de color de azul a amarillo; ΔE: diferencia total de color.

Un fenómeno similar se puede observar en el empaque de almidón-quitosano (Figura 18), en el cual se obtuvo una coloración marrón en pH 1 (valor bajo de a*) mientras que para pH 8, se obtuvo el valor de b* más alto (es la que más tiende hacia el amarillo). Sin embargo, a pH 2 y pH 3 el color no se observa con claridad debido a su alta solubilidad en esos pH. En pH 6, 9 y 10 se observan empaques de color naranja-rojo (valores altos de a* indicando rojo y valores altos de b* indicando amarillo). Las películas en pH 4 y 7 se observan de color naranja (valores intermedios de a* y b*).

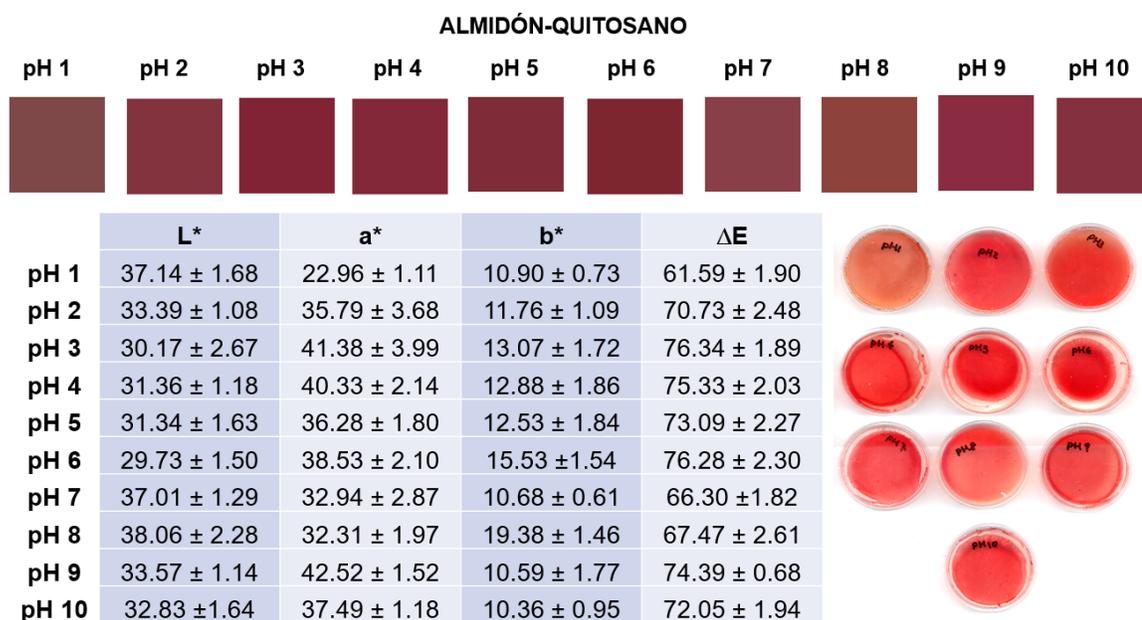


Figura 18. Cambio de color de la película almidón-quitosano adicionada con betalaínas. L*: Luminosidad; a*: parámetro de color de verde a rojo; b*: parámetro de color de azul a amarillo; ΔE: diferencia total de color.

Las películas de quitosano y almidón-quitosano (Figura 17 y 18) muestran que los cambios más prominentes se dieron en pH 1 y pH 2, tornándose naranja. Cuando las betalaínas cambian a color naranja, puede deberse a una descarboxilación. La descarboxilación puede llevarse a cabo en C2, C15 y C17 en la betacianina y C11 y C13 en la betaxantina, provocando una absorción máxima más pequeña (Coy-Barrera y col., 2020). Sin embargo, también es posible que, como en el empaque de almidón (Figura 15), se haya llegado al punto de oxidación, aunque el color obtenido no haya sido marrón, si no naranja. Los cambios de color son diferentes para cada película debido a que el color intrínseco de cada película es diferente. Además, los diferentes componentes afectan el cambio de color. Los resultados obtenidos son similares a lo descrito por Musso y col. (2019) quienes elaboraron películas inteligentes con antocianinas, en las que las películas de extracto acuoso fueron muy tenues lo que no permitió un cambio de color tan visible, en comparación a las de extracto etanólico que mostraron cambios más pronunciados. Los cambios de color pueden deberse también a la actividad de ciertas enzimas cuya actividad depende del pH de la matriz.

Algunos ejemplos de estas son peroxidasa (pH óptimo 6) y polifenoloxidasas (pH óptimo 7) siendo responsables de la degeneración oxidativa de compuestos fenólicos y flavonoides (Kaur y col., 2021). El resultado de la degradación de las betalaínas por enzimas es similar a la degradación producida por tratamientos térmicos, alcalinos o ácidos (Czyżowska y col., 2006)

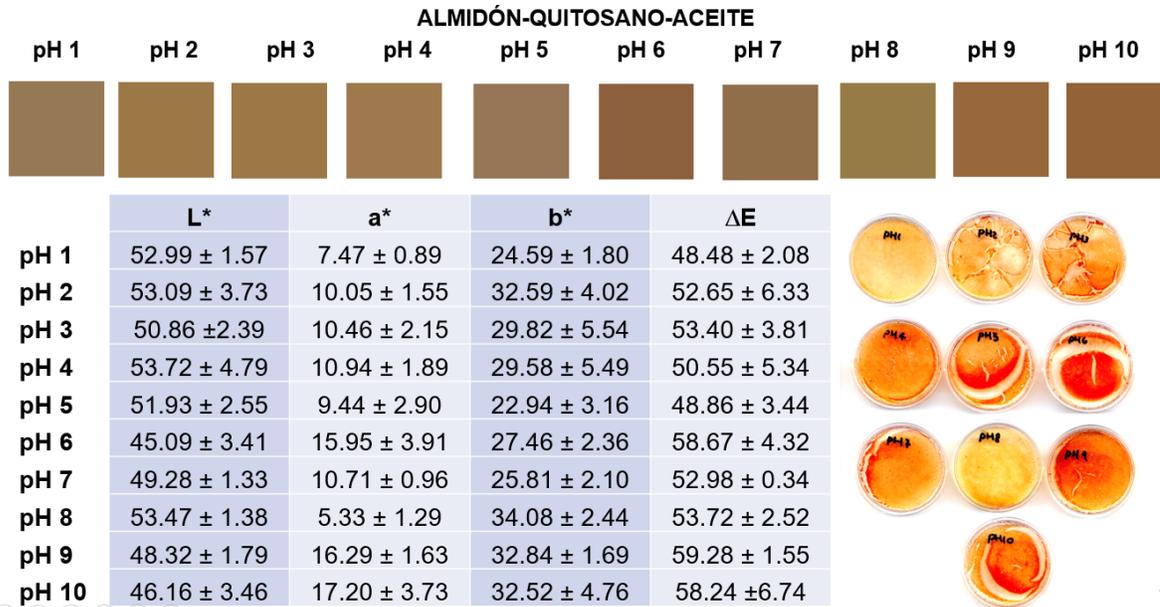


Figura 19. Efecto de pH en el cambio de color de la película almidón-quitosano adicionada con betalaínas y aceite esencial de romero. L*: Luminosidad; a*: parámetro de color de verde a rojo; b*: parámetro de color de azul a amarillo; ΔE: diferencia total de color.

Las Figuras 19 y 20 muestran el empaque de almidón-quitosano adicionadas con aceite esencial de romero y betalaínas, sin embargo, para los empaques de la Figura 19, el aceite esencial se adicionó a la solución de almidón antes de realizar la mezcla con la solución de quitosano. Los empaques presentados en la Figura 20, el aceite esencial se adicionó después de realizar la mezcla de almidón y quitosano. En la Figura 19 el color inicial del empaque es amarillo (valores de a* son negativos en su mayoría). Esto puede deberse a posibles interacciones entre el aceite y betalaínas. Se observan cambios menos pronunciados en comparación a la Figura 18, sin embargo, se observa un color tenue en pH 1 (valor bajo de b*) y naranja fuerte en pH

6 (valores altos de a^* y b^*). Este empaque (Figura 19) presentó diferentes tonalidades de naranja que se comprobaron mediante los parámetros de color. Todos los valores de a^* y b^* son positivos, por lo tanto, tienden hacia rojo y amarillo respectivamente. Para pH 1 se obtuvieron valores relativamente bajos para a^* y b^* por lo que fue la película que más se acerca al origen de la gráfica $L^*a^*b^*$ lo que se traduce a una tendencia hacia el neutro o color gris. A pesar de que el valor de b^* fue el más alto para la película de pH 8, el valor de a^* fue el más bajo, por lo que no se ve roja. Además, se observa que las películas pH 5-10 son de color naranja fuerte debido a un alto valor en b^* (que indica mayor amarillez) y valor alto en a^* (que indica que es más rojo). Esto demuestra que la película adicionada con betalaínas y aceite esencial de romero podría ser efectiva para detectar cambios de color.

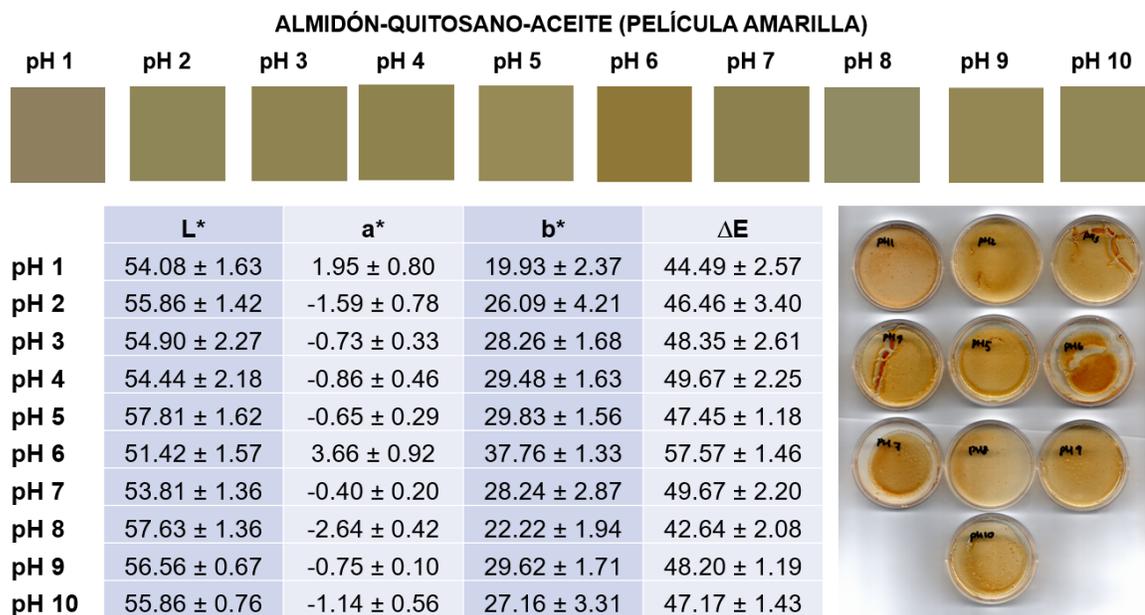


Figura 20. Cambio de color de la película almidón-quitosano adicionada con betalaínas y aceite esencial de romero (amarilla)

También es importante mencionar que el orden en el que se añaden los reactivos es de importancia ya que existen posibles interacciones entre las betalaínas y aceite esencial de romero. Al agregar el aceite esencial de romero al final, se obtiene una película amarilla (Figura 20) que podría indicar la degradación de las betalaínas. A

pesar de que se obtuvieron cambios de color, por ejemplo, en pH 1 y pH 6, no son tan prominentes como los observados en la Figura 19.

6.6. Caracterización del empaque

6.6.1 Propiedades físicas de los empaques

Los resultados obtenidos de humedad, permeabilidad al vapor de agua (PVA) y solubilidad se presentan en el Cuadro 5. El empaque con mayor humedad fue la de almidón (2.28 ± 0.06 %), la adición de quitosano disminuye significativamente el valor de este parámetro siendo Q el que presentó la humedad menor (1.61 ± 0.05 %).

El almidón presentó la mayor humedad debido a su naturaleza hidrofílica y su capacidad de hinchamiento, lo cual provoca una mayor retención de agua. Sin embargo, en presencia de quitosano existen interacciones con el almidón reduciendo los grupos hidrofílicos libres y a su vez la interacción con las moléculas de agua (Zamudio-Flores y col. 2010; Thakur y col. 2017). Como se mencionó anteriormente, la adición de quitosano disminuyó la humedad de los empaques, sin embargo, en presencia del aceite esencial de romero, ésta presentó un valor de 2.04 ± 0.02 %. Estudios han reportado la formación de enlaces covalentes entre aceites esenciales y los grupos funcionales de las cadenas de quitosano, disminuyendo la disponibilidad de grupos hidroxilo y amino, razón por la cual la retención de agua predominante es la del almidón (Ojagh y col., 2010).

El empaque de AQ-R mostró el valor más alto de PVA ($3.29 \pm 0.6 \times 10^{-5} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) y el más bajo el empaque de almidón ($2.08 \pm 0.82 \text{ g} \times 10^{-5} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), sin embargo, no presentaron diferencia significativa entre ellos. El valor de permeabilidad de AQ presentó una menor PVA en comparación al empaque de Q, ya que la mezcla desarrolla una estructura más compacta y densa (Chen y col. 1994). Resultados similares fueron reportados por García y col. (2006) para películas de quitosano-almidón, concluyendo que la disminución de PVA se debe a la compatibilidad de los

polímeros debido a la similitud química y geométrica lineal de estos y por la densidad de carga de los mismos.

A pesar de la naturaleza hidrofóbica del aceite esencial, no hubo un cambio significativo en la PVA. Debido a que la transferencia de vapor de agua ocurre a través de la porción hidrofílica de la película y ésta depende de la relación componente hidrofílica-hidrofóbica, la concentración de aceite pudo no ser la suficiente para tener un efecto significativo en esta propiedad (Abdollahi y col. 2019). El aumento de PVA en presencia del aceite esencial se puede atribuir al efecto plastificante de este, lo cual aumenta la movilidad de las cadenas del quitosano facilitando el transporte de moléculas de agua a través del empaque (Souza y col. 2019). Estudios han reportado que la presencia de aceite de romero en empaques de quitosano, generan estructuras agrietadas, y esto a su vez una mayor cantidad de espacio libre en la red facilitando el paso de las moléculas de agua a través del empaque (Abdollahi y col. 2012).

Cuadro 5. Propiedades físicas de los empaques

Película	Humedad (%)	PVAx10⁵ (g m⁻² s⁻¹ Pa⁻¹)	Solubilidad (%)
A	2.28 ± 0.06 ^a	2.08 ± 0.82 ^a	36.43 ± 9.86 ^a
Q	1.61 ± 0.05 ^b	3.20 ± 0.50 ^a	53.85 ± 4.38 ^b
AQ	1.90 ± 0.06 ^c	2.26 ± 0.78 ^a	53.49 ± 7.48 ^b
AQ-R	2.04 ± 0.02 ^d	3.29 ± 0.60 ^a	66.77 ± 4.84 ^c

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar. PVA: permeabilidad al vapor de agua; Q: Quitosano; A: Almidón; R: Aceite esencial de romero. ^{a-c} Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa (p>0.001)

El empaque con menor solubilidad es el elaborado con almidón (36.43 ± 9.86 %). Valores similares fueron reportados por (Colussi y col., 2017) quienes en películas de almidón acetilado obtuvieron porcentajes de solubilidad cercanos a 30%. La solubilidad de estos empaques se puede atribuir a la facilidad de penetración del agua dentro de los empaques y a una menor retrogradación del almidón. La alta solubilidad de los empaques a base de quitosano se debe a su grado de acetilación y peso

molecular, ya que materiales de quitosano con alto peso molecular y grado de acetilación son solubles en medios acuosos ácidos, y éstos al presentar un pH 3 favorece su solubilidad (Aranaz y col., 2021). De los resultados obtenidos se puede observar que la película con mayor solubilidad es la adicionada con aceite esencial. El aumento de este parámetro puede deberse a que las cadenas de amilosa interactúan con la parte hidrofóbica del aceite en su cavidad helicoidal estructurando complejos de inclusión, aumentando de esta manera la dispersión de las moléculas de almidón en el medio ácido contribuyendo a una mayor solubilidad (Hashim y col., 2020; Shi y col., 2021; Torres-Alvarez y col., 2020)

6.6.2. Propiedades mecánicas de los empaques

En el Cuadro 6 se muestran el espesor y las propiedades mecánicas de los empaques (fuerza de tensión y porcentaje de elongación). La película con mayor espesor fue la de almidón ($0.20 \pm 0.01 \mu\text{m}$), sin embargo, se puede observar que la adición de quitosano generó empaques con espesores menores espesores. El espesor del empaque de almidón es mayor debido a su porcentaje de acetilación, ya que la presencia de grupos acetilo genera un alto hinchamiento de los gránulos de almidón y por lo tanto mayor espesor (Mehboob y col. 2020). El poder de hinchamiento se le atribuye a una región cristalina desordenada lo que permite una asociación entre grupos hidroxilo y moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno (Detduangchan y col. 2014).

La fuerza de tensión (FT) permite conocer la resistencia al desgarre de los materiales, por lo que empaques con valores bajos de FT son indicativos de empaques quebradizos (Shariatinia y col., 2015). El empaque con mayor FT es el elaborado con Q ($52.44 \pm 8.27 \text{ MPa}$) siendo el empaque AQ el que presenta el valor más bajo en este parámetro ($16.38 \pm 1.73 \text{ MPa}$). Estos resultados son contradictorios a lo reportado por otros autores quienes han reportado que la mezcla de almidón-quitosano genera materiales con mayor FT debido a interacción entre el grupo amino del quitosano y el grupo hidroxilo del almidón (Perdana y col. 2021). Algunos estudios han reportado que la adición de pigmentos en películas de quitosano con otros

polímeros pueden generar estructuras heterogéneas con áreas intermitentes en la matriz de los empaques disminuyendo la FT (Kan y col., 2019), es por esto que el empaque AQ con betalaínas presenta la menor FT. Se puede observar que el empaque AQ-R no presenta diferencia significativa en FT con el empaque de A, esto se debe a las posibles interacciones de los polímeros con el aceite. De acuerdo con lo reportado por (Atarés y Chiralt, 2016) la adición de aceite en matrices de quitosano podría llevarse un efecto de reticulación aumentando significativamente la resistencia a la tracción por lo que la adición del aceite de romero presenta mayor FT en comparación a AQ.

Cuadro 6. Propiedades mecánicas de los empaques

Película	Espesor (mm)	FT (MPa)	Elongación (%)
A	0.20 ± 0.01 ^a	24.86 ± 3.34 ^a	36.65 ± 4.72 ^a
Q	0.11 ± 0.01 ^b	52.44 ± 8.27 ^b	35.71 ± 7.36 ^a
AQ	0.14 ± 0.01 ^c	16.38 ± 1.73 ^c	37.74 ± 3.57 ^a
AQ-R	0.12 ± 0.01 ^b	24.30 ± 5.11 ^a	39.78 ± 0.3 ^a

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar. A-Q: Quitosano; A: Almidón; R: Aceite esencial de romero. ^{a-c} Valores con letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa (p>0.001).

Los empaques elaborados no presentan diferencias significativas respecto a porcentaje de elongación, por lo que las posibles interacciones entre los diferentes componentes no afectan en este parámetro. Sin embargo, el porcentaje de elongación elaborados con otros polímeros, tales como proteína de suero lácteo presentan un porcentaje de elongación el 36%. El porcentaje de elongación de los biopolímeros son menores a los que se han obtenido a partir de empaques elaborados de plásticos a base de petróleo, tales como el polietileno de baja densidad (190%), el polietileno de alta densidad (380%), polietileno tereftalato (130%). Éste último tiene una FT similar (55 Mpa) al del quitosano (52.44 ± 8.27 Mpa) (Ryder y col., 2017).

6.6.3 Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 21 se muestra la microestructura de los diferentes empaques elaborados. La estructura del empaque de almidón se observa rugosa (Figura 21a), que podría corresponder a estructuras de almidón insoluble. El empaque de Q (Figura 21b) presenta una superficie más lisa, sin embargo, las irregularidades se atribuyen a la presencia de poros los cuales dependen del grado de acetilación y peso molecular, así como a la formación de aglomeraciones. El empaque AQ (Figura 21c) mostró una superficie más lisa en comparación al empaque de almidón indicando una buena compatibilidad entre los componentes, una posible reducción de regiones cristalinas de quitosano al mezclarse con el almidón. Se puede apreciar que la adición de aceite al empaque AQ (Figura 21 d) generó una superficie más homogénea en comparación a AQ sin aceite esencial, esto indica una buena incorporación del aceite en la matriz del empaque. La obtención de superficies lisas con el aceite esencial sugiere la presencia de interacciones químicas entre la matriz polimérica y el aceite (Venkatachalam y col, 2023; de Britto y col. 2010; López-Mata y col., 2013; Xu y col., 2005; Zuo y col., 2019)

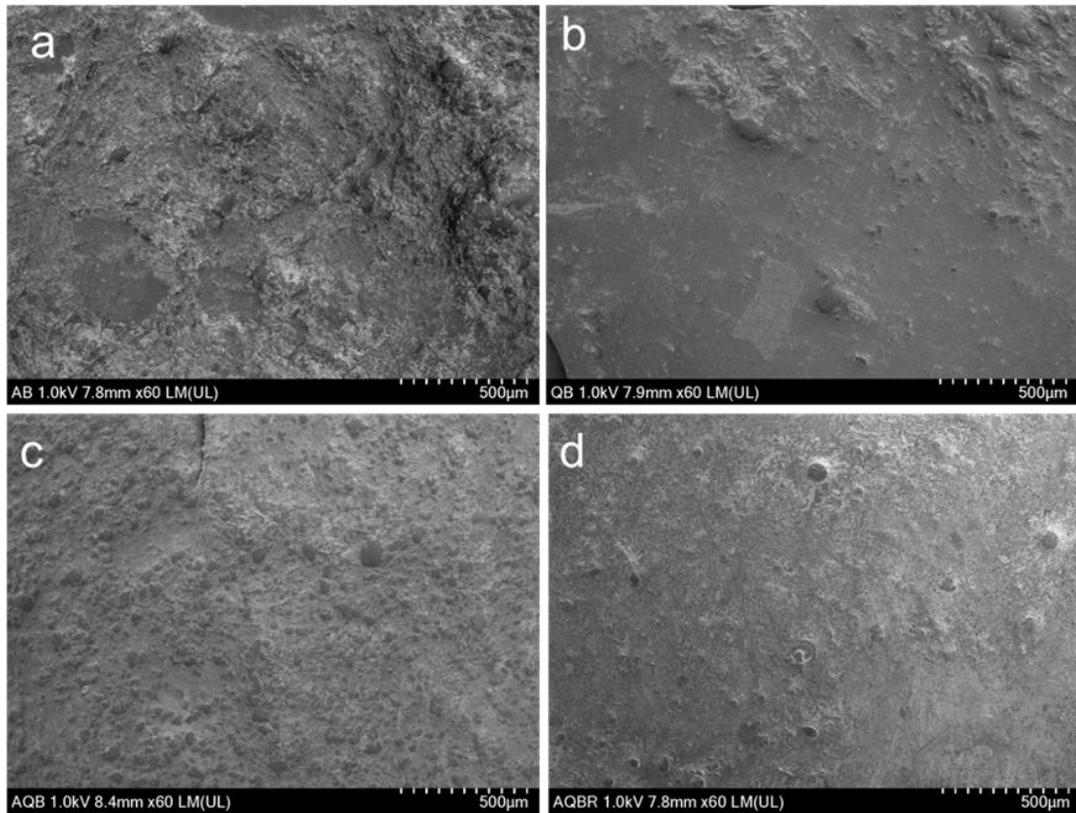


Figura 21. Micrografías de empaque con betalaínas (1.0 kV, x60). a) Empaque de almidón-betalaínas, b) Empaque de quitosano-betalaínas, c) Empaque de almidón-quitosano-betalaínas, d) Empaque de almidón-quitosano-aceite esencial de romero-betalaínas.

6.6.5. Microscopía de Fuerza Atómica

En la Figura 22 se muestra la topografía de los empaques elaborados. Se puede observar que existen cambios en la superficie de los empaques inclusive al nivel nanométrico. El empaque de almidón (Figura 26a), muestra una aparente distribución homogénea en su superficie, pero al revisar su índice de rugosidad cuadrática, R_q (Cuadro 7), se observa que es el empaque que tiene mayor rugosidad. Lo mismo se puede observar en su rugosidad de cresta a valle (R_{pv}), el empaque cuenta con grandes crestas y valles en el orden micrométrico lo que le da una apariencia porosa a la superficie del empaque. Entre mayor sea el índice de R_{pv} , la superficie presenta más crestas y valles causando un aumento directamente proporcional de la rugosidad del empaque. López-Mata, et al (2013) reportaron valores altos en la rugosidad de empaques de almidón y atribuyeron a los altos niveles de acetilación que causan el

aumento de volumen de las moléculas de almidón al asociarse con moléculas de agua.

En cambio, el empaque de quitosano (Figura 26b) muestra la acumulación de aglomerados en la superficie del empaque. Los aglomerados formados muestran una longitud de 62.68 ± 38.26 nm. No obstante, pese a la formación de aglomerados en la superficie del empaque estos se encuentran en el orden de los nanómetros, por lo cual su R_q se mantiene en 3.81 ± 0.78 nm (Cuadro 7). En comparación con el almidón, el quitosano tiene una menor rugosidad lo que le permite la formación de películas más homogéneas y menos porosas como se puede comprobar con la $R_{pv} = 44.25 \pm 1.69$ nm del quitosano (Ozturk y col., 2020).

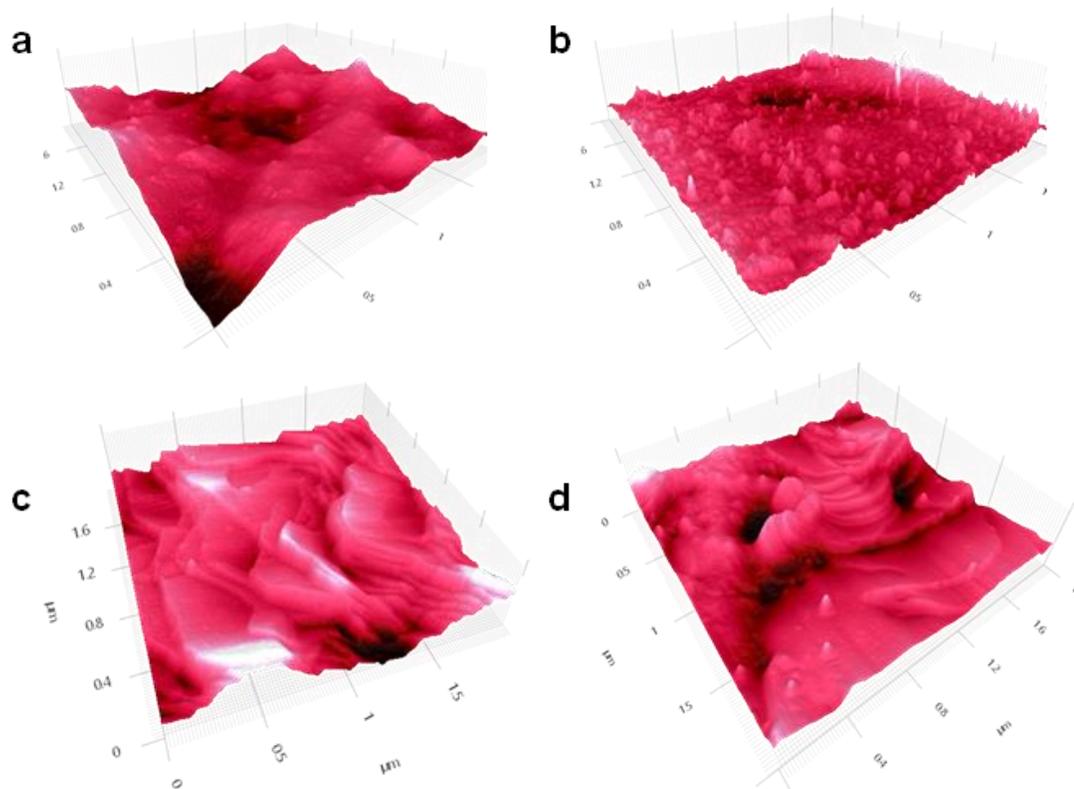


Figura 22. Micrografías 3D de Fuerza Atómica de la topografía superficial ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) de los empaques. a) Almidón. b) Quitosano. c) Almidón-Quitosano. d) Almidón-Quitosano + Aceite esencial.

Los resultados de rugosidad de los empaques de AQ & AQ + R no muestran diferencia estadísticamente significativa entre ellos. La mezcla de almidón y quitosano, independientemente del aceite esencial de romero, muestra características únicas en la rugosidad de la superficie de los empaques. La morfología de la superficie de estos empaques muestra la formación de “oblas” o múltiples capas que recubren la superficie. Esta diferente estructura con aparente forma de cristal se puede atribuir a la interacción de los grupos aminos del quitosano y los grupos hidroxilo del almidón interactuando con la betalaína (Perdana y col. 2021). Debido a la interacción del almidón y la formación de estas capas podemos observar un aumento de la rugosidad en comparación al quitosano, pero la plasticidad del quitosano permite que estos empaques (AQ & AQ + R) mantengan una rugosidad media en comparación a los otros empaques (Cuadro 7).

El sesgo de Rugosidad o Rsk (Roughness skewness), es el parámetro que mide la desviación de los datos, en este caso la rugosidad, mide la simetría de la distribución. Los empaques de almidón y quitosano muestran un Rsk virtualmente igual a '0', lo que podemos interpretar como una superficie donde la cantidad de crestas y valles es equivalente, o la cantidad de poros y aglomeraciones es proporcional. Para el empaque de quitosano, el Rsk indica que existe un mayor número de aglomeraciones o crestas en la superficie y en el caso contrario encontramos al almidón con un valor negativo de Rsk, indicando una mayor concentración de poros (Duboust y col., 2017).

Aumentando el área de escaneado en el Microscopio de Fuerza Atómica podemos observar los cambios de rugosidad en la microescala (Figura 23). El comportamiento y distribución de los materiales en la superficie es similar en esta ocasión cuando comparamos la escala nanométrica y la escala micrométrica. El almidón muestra gran concentración de poros de diversos tamaños desde los 61 nm hasta 4.2 μm . El empaque de quitosano muestra una superficie más homogénea en comparación al almidón y esto se debe a que los aglomerados que forman la superficie solo se pueden observar en la escala nanométrica. Los empaques formados por mezclas

de materiales (AQ & AQ+R) presentan las características superficiales de ambos materiales, con la particularidad que la Figura 23d muestra aglomerados en su superficie del tamaño esperado para las gotas de aceite. Las gotas de aceite no se observan en las micrografías de 2 um x 2 um ya que sobrepasan el tamaño del área de escaneado.

Cuadro 7. Rugosidad Cuadrática, Rugosidad de Pico a Valle, Sesgo de Rugosidad

Empaque	Rq [nm]	Rpv [nm]	Rsk
A	46.79 ± 15.62 ^a	300.1 ± 57.52 ^a	-0.15 ± 0.16 ^a
Q	3.81 ± 0.78 ^b	44.25 ± 1.69 ^b	1.08 ± 0.14 ^b
AQ	14.63 ± 3.37 ^c	99.63 ± 21.64 ^c	0 ± 0.15 ^a
AQ + R	11.67 ± 2.93 ^c	96.19 ± 13.66 ^c	0.83 ± 0.93 ^b

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar. Q:

Quitosano; A: Almidón; R: Aceite esencial de romero; Rq: Rugosidad Cuadrática; Rpv: Rugosidad de Pico a Valle; Rsk: Sesgo de Rugosidad. ^{a-d}

Valores con letras iguales en la misma columna, no presentan diferencia significativa ($p > 0.001$)

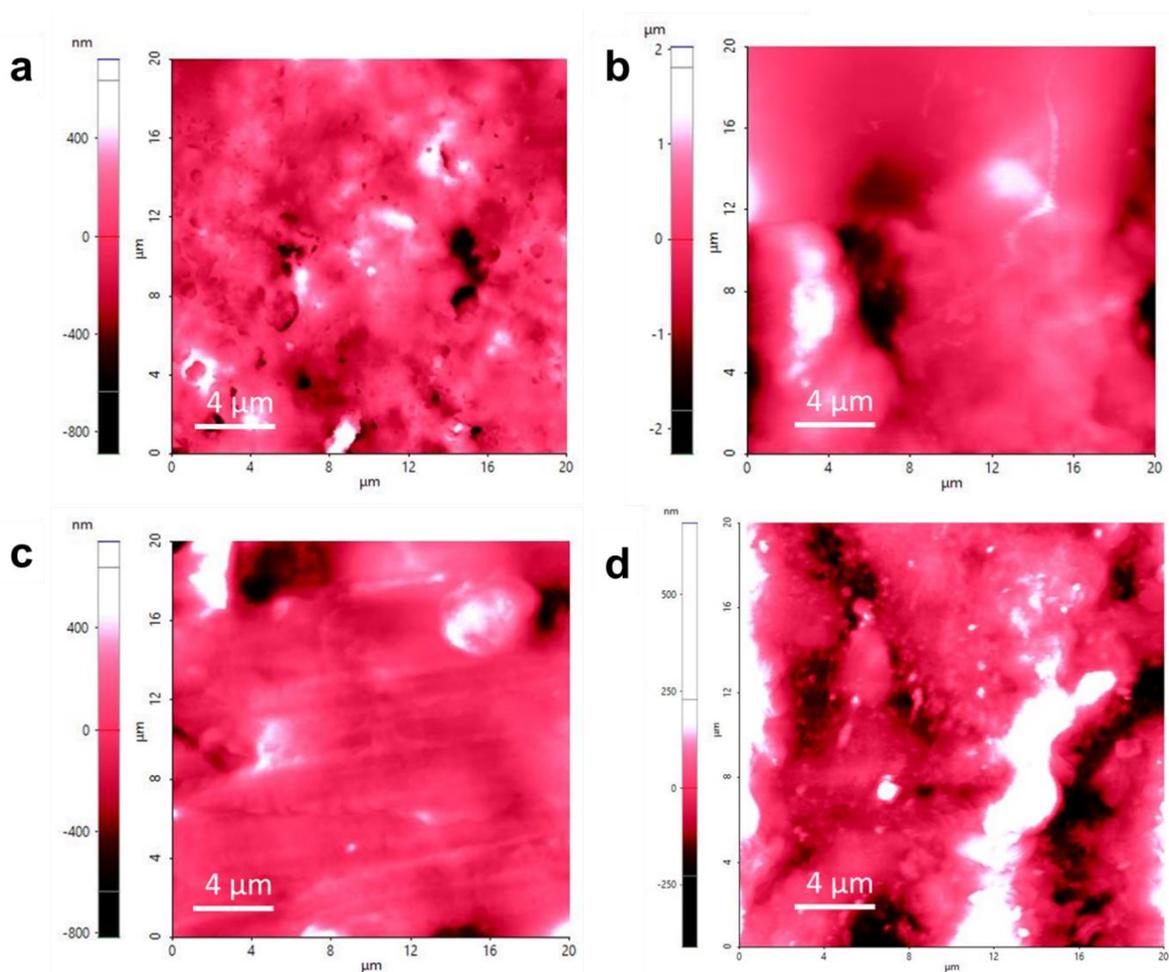


Figura 23. Imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica de la superficie de los empaques (20 μm x 20 μm). a) Almidón. b) Quitosano. c) Almidón-Quitosano. d) Almidón-Quitosano + aceite esencial.

6.6.4. FT-IR

Para observar las interacciones entre los componentes de las películas, se realizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. En la Figura 24 se presentan los espectrogramas correspondientes al empaque de almidón, betalaínas libres y la mezcla de estos. Se puede observar que predominan los enlaces C=O y O-H del grupo carboxilo, así como O-H del grupo hidroxilo. Por parte del almidón, se observan mayormente O-H (grupo hidroxilo), C-H (de la cadena polimérica) y C-O.

Las bandas obtenidas en la betalaínas coinciden con lo reportado por Singh y col. (2017), Barkociová y col. (2021), Aztatzi-Ruggerio y col. (2019) y Devadiga y col. (2020) quienes obtuvieron betalaínas de betabel, así como Popescu y col. (2021) quienes obtuvieron betalaínas de tuna. En 783 cm^{-1} se obtuvo una banda de baja intensidad correspondiente a C-COOH, mientras que las bandas en 1043 cm^{-1} , 1203 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , corresponden a C-O-C, C-O del ácido carboxílico y C-H, respectivamente. Las bandas en 1711 cm^{-1} y 2540 cm^{-1} corresponden a C=O y C-H respectivamente, ambos enlaces del ácido carboxílico. Por último, las bandas en 1711 cm^{-1} y 2540 cm^{-1} corresponden a C-H y O-H.

El espectro del empaque de almidón presentó un espectro similar a lo reportado por Pinzon y col. (2018), Mathew y col. (2008) y Bourtroum y col. (2008) quienes trabajaron con películas a base de almidón. Se observa una banda en 1367 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} correspondientes a O-H del agua, en 2916 cm^{-1} correspondiente a C-H de los grupos CH_2 y CH_3 . Existe una banda ancha centrada en 3342 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de estiramiento O-H de los grupos hidroxilo en las moléculas de almidón y el agua absorbida. La adición de betalaínas causa una desaparición en la banda 1203 cm^{-1} (C-O) de las betalaínas y 1367 cm^{-1} (O-H del agua). Esto se puede deber a una interacción entre C-O de los grupos carboxilo de las betalaínas con el agua, que a su vez interacciona con los grupos hidroxilo del almidón mediante puentes de hidrógeno como lo observaron Halloub y col. (2023).

En la Figura 25 se muestran los espectrogramas de las betalaínas libres y del empaque de quitosano con y sin betalaínas. Se observan bandas características de los grupos funcionales del quitosano (C-OH, O-H, N-H y C-H). La banda 1412 cm^{-1} corresponde a un O-H, mientras que la banda 1576 cm^{-1} representa a N-H de la amida secundaria. La banda 2917 cm^{-1} indica un enlace C-H mientras que la banda 3277 cm^{-1} puede tratarse de un O-H que se superpone con un N-H. (Xu y col. 2005; Hosseini y col. 2013; Jridi y col. 2014; Mohamed y col. 2015; Samprasit y col. 2018).

La adición de betalaínas a la matriz de quitosano causa una desaparición de O-H (2634 cm^{-1}) así como de la banda centrada aproximadamente a 1100 cm^{-1} que podría corresponder a C-N de las betalaínas. También disminuye la intensidad en la banda 1202 cm^{-1} (C-O) y 1710 cm^{-1} (C=O) correspondiente de las betalaínas. Existe un aumento de intensidad en las bandas centradas aproximadamente en 2850 cm^{-1} y 2917 cm^{-1} (C-H) provenientes del quitosano. Las principales interacciones entre el quitosano y las betalaínas podrían ser mediante interacciones electrostáticas entre los grupos amino (cargados positivamente) del quitosano y los grupos carboxilo (cargados negativamente) de las betalaínas (Namazzadeh y col., 2022).

En la Figura 26 se observan las posibles interacciones del empaque elaborado a partir de la mezcla AQ y las betalaínas. En los espectros obtenidos se observan las bandas correspondientes a almidón y quitosano descritas anteriormente (Figura 24 y Figura 25). Sin embargo, no se observó la banda 1640 cm^{-1} (O-H) del almidón, así como la banda 1412 cm^{-1} (C-H) del quitosano. Además, se presentó una mayor intensidad en las bandas 2850 y 2916 cm^{-1} (C-H). Es por lo que la interacción entre almidón y quitosano se pudo haber dado mediante puentes de hidrógeno (Liu y col., 2013).

La adición de betalaínas en este empaque causa la desaparición de la banda 784.4 cm^{-1} (C-COOH) de las betalaínas, así como de la banda 1378 cm^{-1} (O-H) del almidón. Existe disminución de las bandas 1035 cm^{-1} (C-OH del quitosano), 1396 cm^{-1} (O-H del almidón), así como la banda 3434 cm^{-1} (O-H de almidón y O-H y N-H del quitosano). Por lo que también se podría tratar de interacciones mediante puente de hidrógeno entre los 3 componentes principales (almidón, quitosano y betalaínas).

En la Figura 27 se muestra el espectro del empaque AQ con aceite esencial de romero con y sin betalaínas. Se observan bandas características del aceite esencial de romero reportados por Agatonovic-Kustrin y col. (2020) y Amani y col. (2021) en 1100 cm^{-1} (C-O de componentes terpenoides) y en 1722 cm^{-1} (C=O proveniente de éster). La adición de las betalaínas causa la desaparición de la banda 1722 cm^{-1} (C=O del aceite esencial de romero). Por lo que podría sugerir que existe interacción entre el

aceite y algún componente de la película (almidón, quitosano o betalaínas). Además, se disminuye la banda 1710 cm^{-1} correspondiente a C=O de las betalaínas. Es importante notar que la adición de aceite esencial de romero causa la desaparición de la señal de C-H ya sea de almidón o quitosano (2850 o 2016 cm^{-1}), sin embargo, al adicionar betalaínas, se retienen ambas bandas.

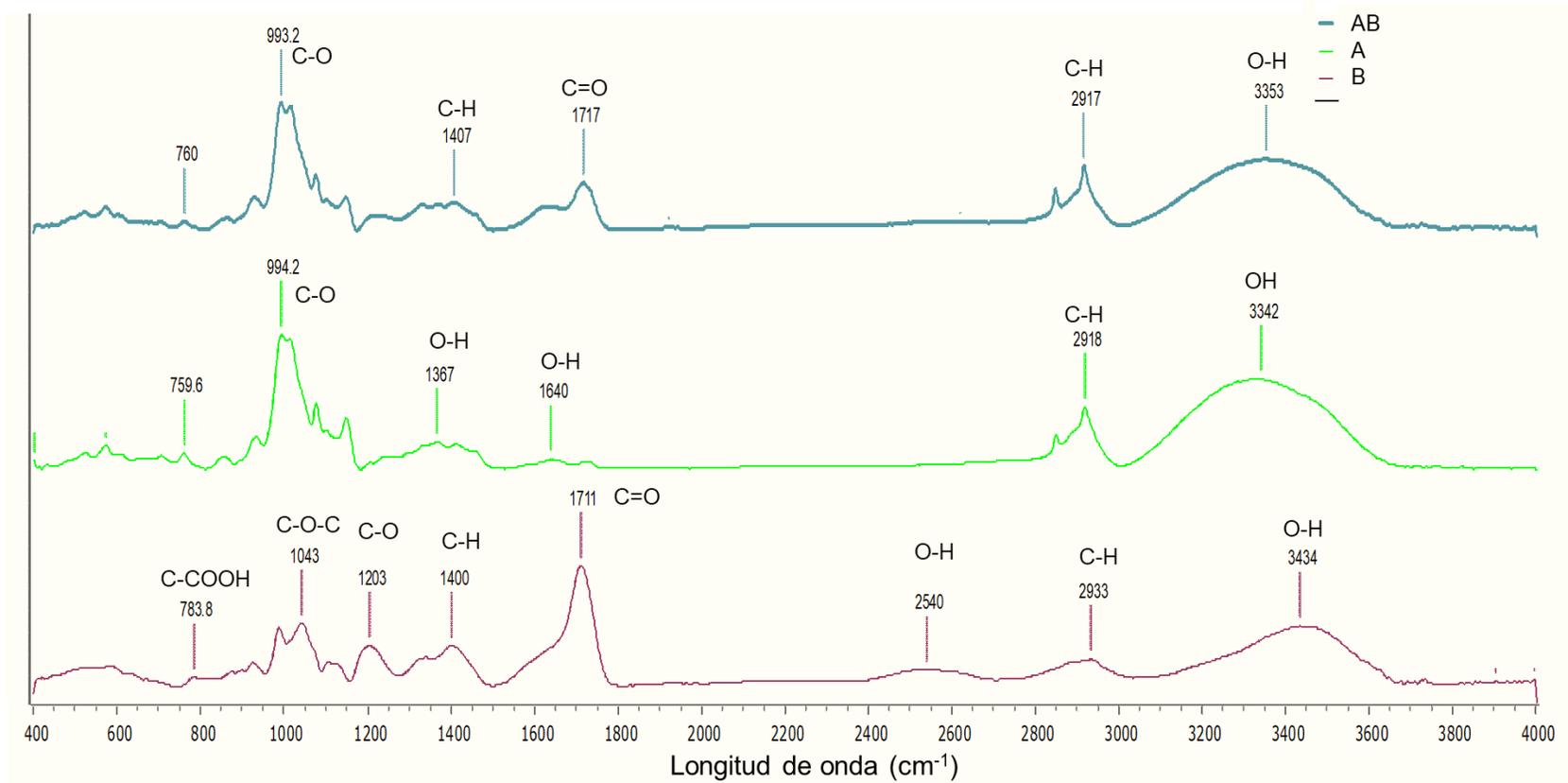


Figura 24. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques de almidón. A: empaque de almidón; B: betalaínas libres; AB: empaque de almidón con betalaínas.

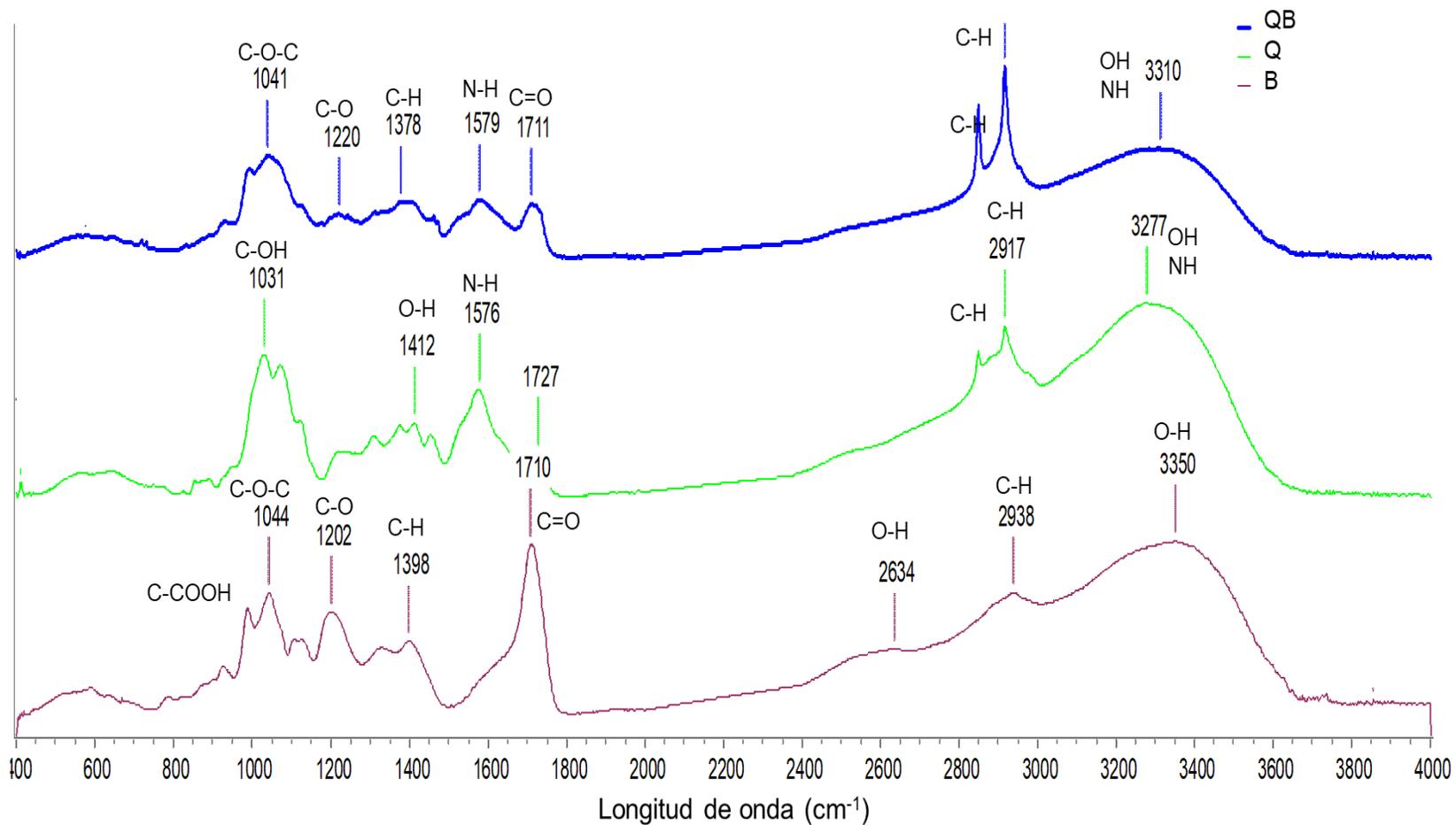


Figura 25. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques de quitosano. Q: empaque de quitosano; B: betalaínas libres; QB: empaque de quitosano con betalaínas.

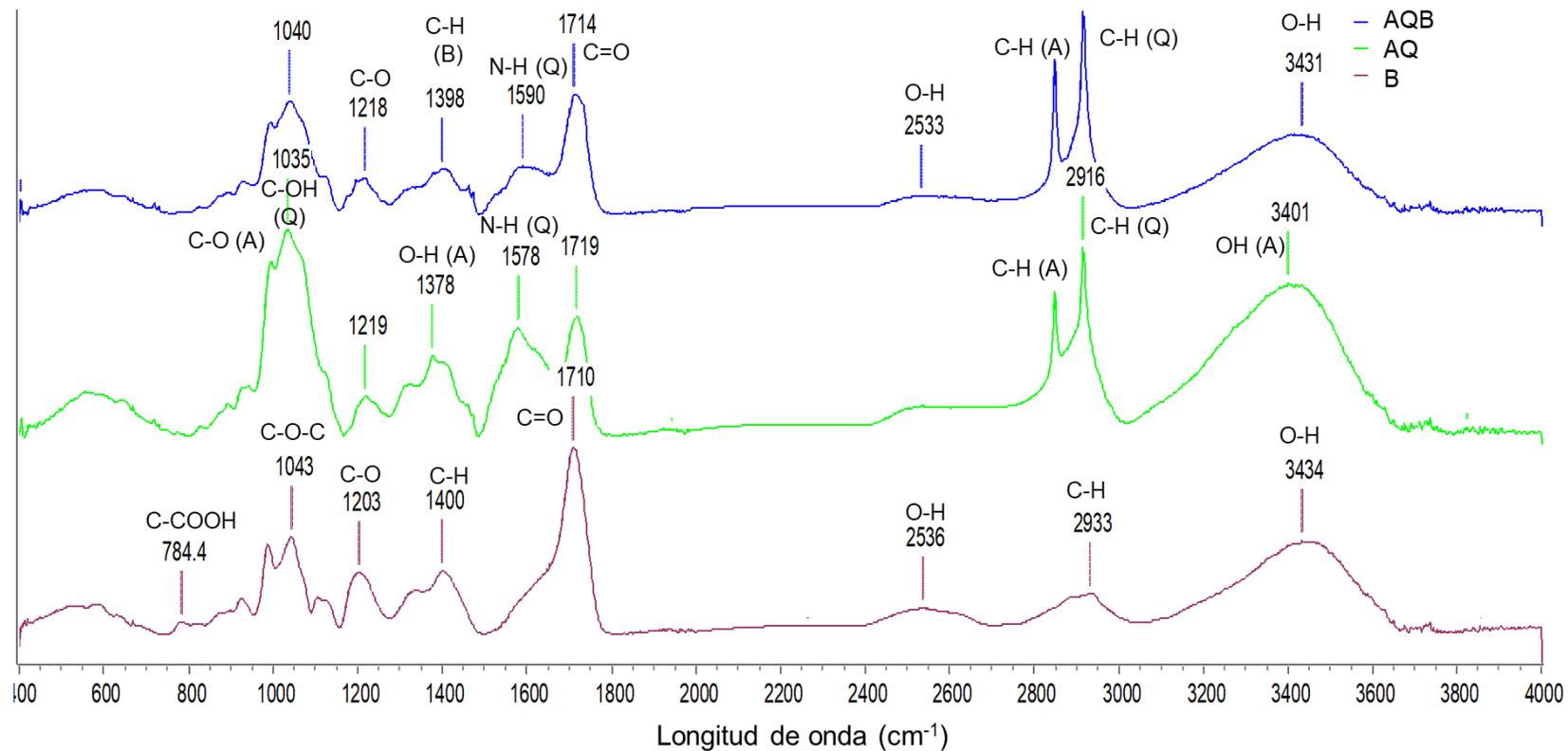


Figura 26. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques almidón-quitosano. AQ: empaque almidón-quitosano; B: betalaínas; AQB: empaque almidón-quitosano con betalaínas.

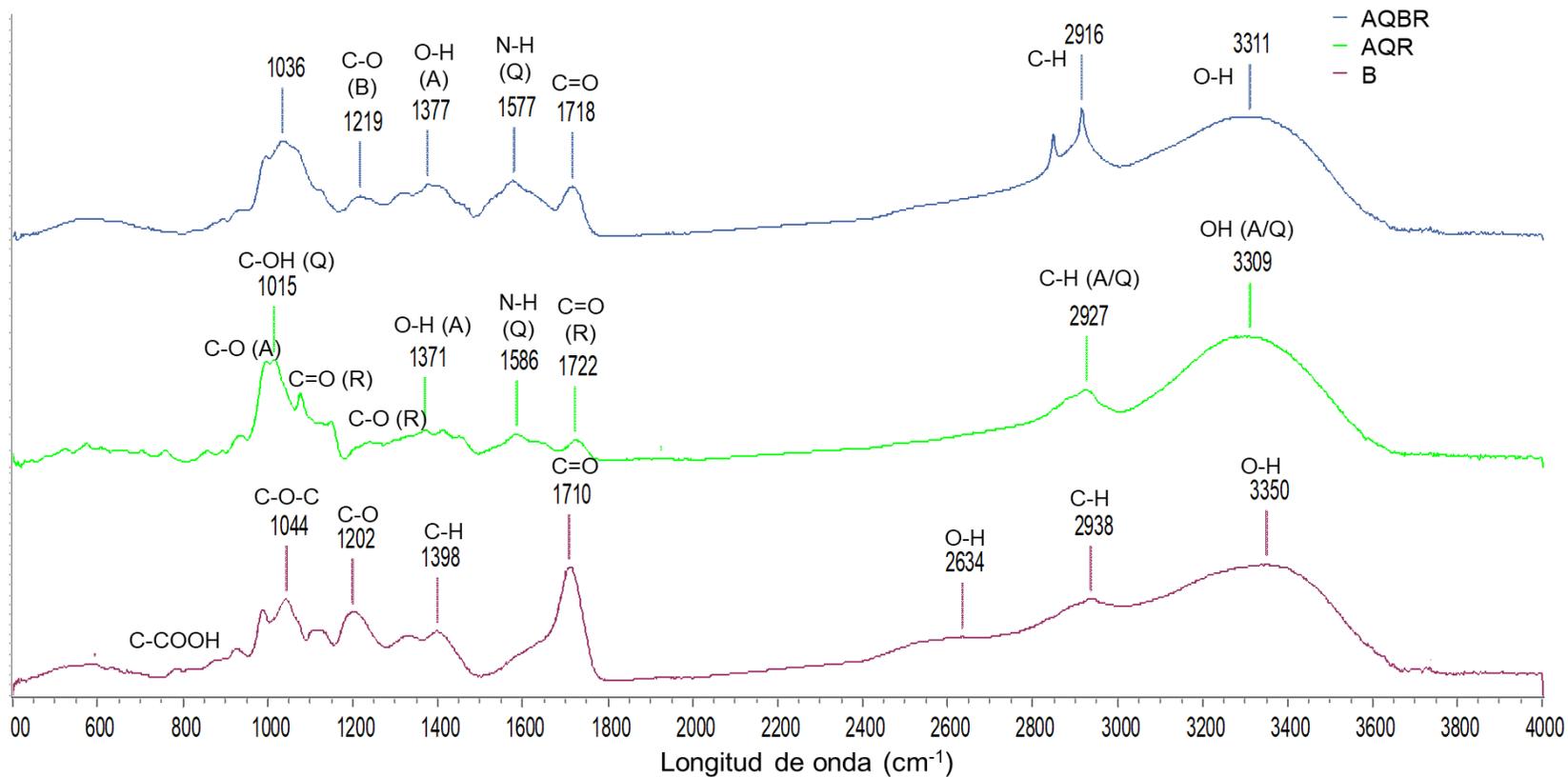


Figura 27. Espectro FT-IR de las betalaínas y empaques almidón-quitosano con aceite esencial de romero. AQR: empaque almidón-quitosano con aceite esencial de romero; B: betalaínas; AQBR: empaque almidón-quitosano con aceite esencial de romero y betalaínas.

6.6.6. Actividad antimicrobiana de los empaques

A partir de la Figura 28 se muestra la actividad antimicrobiana de los diferentes empaques. Se observa que la película de quitosano tiene actividad antimicrobiana por sí sola. Similares resultados fueron reportados por Vásconez y col. (2009) quienes obtuvieron la mayor zona de inhibición con quitosano y observaron una reducción en el halo al combinar el quitosano con almidón de tapioca. En el presente estudio, el halo de inhibición de quitosano es similar al de la mezcla almidón-quitosano. Se ha reportado que el quitosano es agente antimicrobiano. Uno de los factores que influye es el grado de desacetilación; entre mayor sea, mayor será la solubilidad y densidad de carga protónica los cuales son factores que influyen en la adhesión del quitosano a la pared celular de los microorganismos. La densidad de carga protónica se define como la capacidad que tiene el quitosano para pasar de NH_2 A NH_3^+ , éste último es capaz de interactuar con las estructuras externas de los microorganismos y causar su desestabilización (Valencia, 2015).

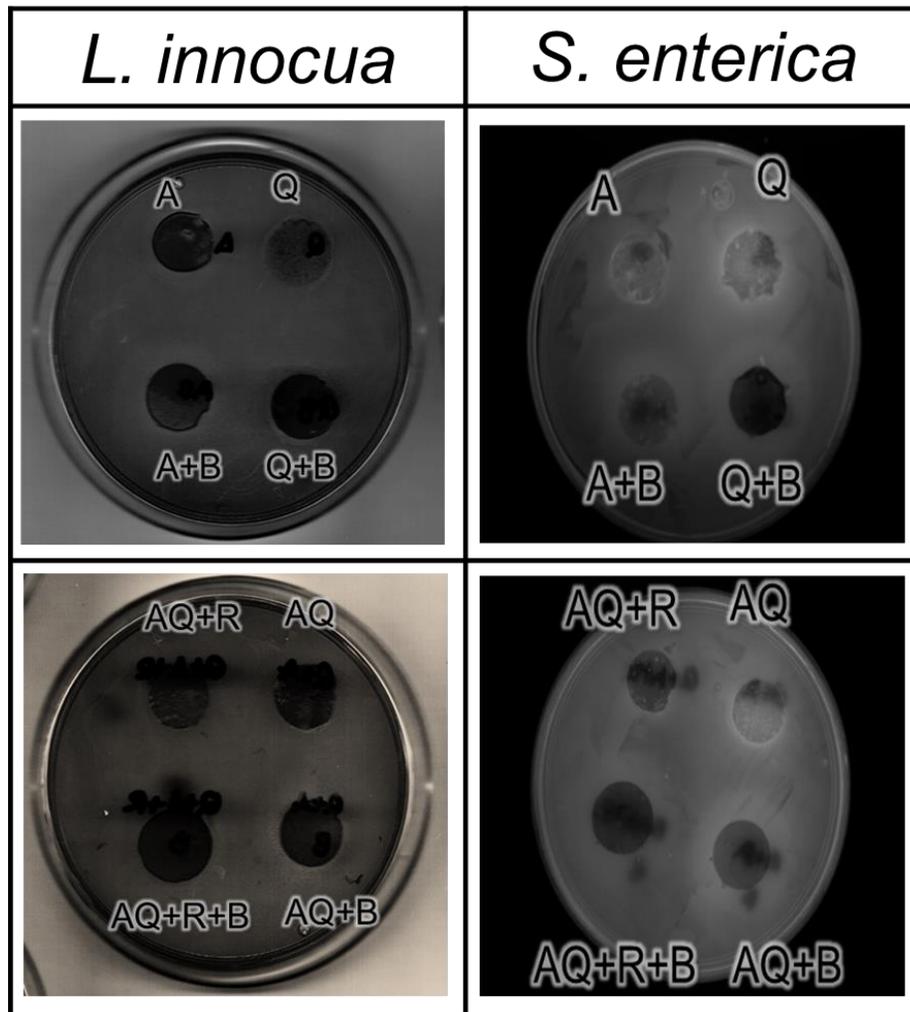


Figura 28. Actividad antimicrobiana de las películas. A: Almidón; Q: Quitosano; R: Aceite esencial de romero; B: Betalaínas.

Se observa inhibición por parte del quitosano ante *L. innocua* y *S. enterica*, ésta última presentó un mayor halo a pesar de contar con la membrana externa que les confiere protección a muchos antimicrobianos. Chung y col., (2004) obtuvieron resultados similares y explicaron que el mecanismo de acción del quitosano es diferente para las Gram negativas y positivas. Las bacterias Gram negativas tienen cationes en su membrana externa, los cuales son estabilizados por grupos fosfato y carboxilo (cargas negativas). El quitosano, al tener capacidad quelante, puede formar complejos con estos cationes, lo que desestabiliza y causa lisis de la membrana. En cambio, las bacterias Gram positivas tienen polímeros con carga negativa (ácido

lipoteicoico y peptidoglicanos) los cuales pueden interaccionar con los grupos NH_3^+ provocando también lisis celular. Dutta y col. (2009) describieron que entre mayor sea el peso molecular del quitosano, mayor será la actividad antimicrobiana ante Gram positivas ya que el quitosano forma una membrana en la superficie de la célula que impide la entrada de nutrientes a la célula. Para Gram negativas la actividad antimicrobiana es mayor cuando el peso molecular es menor y en este caso, el quitosano entra a la célula a través de penetración. En este estudio, el quitosano usado (peso molecular medio) fue más efectivo ante Gram negativas que positivas. La actividad antimicrobiana de las betalaínas demostrada a través de las curvas de crecimiento, se mantiene y se observa en los halos de inhibición, los cuales se potencializaron al adicionar las betalaínas. Se esperaba que la adición del aceite esencial de romero actuara en sinergia con las betalaínas para inhibir a ambas bacterias. Si bien se observa un halo de inhibición con la adición de aceite esencial de romero, no es tan prominente como el de AQ y AQ+B. Ochoa y col. (2017) requirieron aumentar por 5 veces la MIC obtenida en curvas de crecimiento para observar halo de inhibición. Esto se debe a que, existe una mayor difusión en forma líquida que en película, donde la interacción entre los componentes de la película dificulta la difusividad y efecto del agente antimicrobiano. Además, debido a que se usó aceite esencial de romero de forma libre (sin encapsular), al momento del secado de las películas, el aceite pudo haber perdido sus componentes volátiles, reduciendo su actividad antimicrobiana (de Benito y col. 2021).

7. CONCLUSIONES

Las betalaínas son pigmentos naturales que sirven como indicadores de cambio de pH, sin embargo, no presentan estabilidad durante tiempos prolongados de almacenamiento. El comportamiento en el cambio de color de las betalaínas en los empaques depende de la matriz que se esté utilizando, sin embargo, en todos los empaques se presentó cambio de color, por lo que la matriz a utilizar dependerá de la aplicación a la cual de destine el empaque. El adicionar otros aditivos a la matriz del empaque produce interacciones que afectan directamente en el color inicial de este, así como el orden en el que estos sean adicionados. Las betalaínas, además

de servir como indicadores de pH, también mostraron actividad antimicrobiana ante *L. innocua* y *S. enterica*, siendo mayor la actividad antimicrobiana ante bacterias Gram negativas. El pH del medio en el cual se elaboraron los empaques fomentó las interacciones de los diferentes componentes presentes en los empaques. La adición del aceite esencial de romero mejoró algunas de las propiedades de los empaques tales como la fuerza de tensión y el % elongación, sin embargo, aumentó la permeabilidad al vapor de agua y la solubilidad de los empaques. La mezcla de los polímeros (almidón y quitosano) mejoró las propiedades de barrera, el % de elongación y la actividad antimicrobiana en comparación a los empaques elaborados a partir de los compuestos sin mezclar.

8. REFERENCIAS

- Abdo** E, El-Sohaimy S, Shaltout O, Abdalla A, Zeitoun A. Nutritional evaluation of beetroots (*Beta vulgaris* L.) and its potential application in a functional beverage. *Plants*. **2020**;9:1-17.
- Abdollahi** M, Damirchi S, Shafafi M, Rezaei M, Ariaii P. Carboxymethyl cellulose-agar biocomposite film activated with summer savory essential oil as an antimicrobial agent. *Int J Biol Macromol*. **2019**;126:561-8.
- Abdollahi** M, Rezaei M, Farzi G. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *Int J Food Sci & Technol*. **2012**;47(4):847-53.
- Agarwal** M, Agarwal MK, Shrivastav N, Pandey S, Gaur P. A simple and effective method for preparation of chitosan from chitin. *Int J Life Sci*. **2018**;41:721-1728.
- Agatonovic-Kustrin** S, Ristivojevic P, Gegechkori V, Litvinova TM, W. Morton D. Essential oil quality and purity evaluation via ft-ir spectroscopy and pattern recognition techniques. *Applied sciences*. **2020**;10(20):7294.
- Alizadeh-Sani** M, Mohammadian E, Rhim JW, Jafari SM. pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. *Trends Food Sci Technol*. **2020**;105:93-144.
- Álvarez-Martínez** FJ, Barraión-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*. **2021**;90:1-16.
- Amani** F, Sami M, Rezaei A. Characterization and antibacterial activity of encapsulated rosemary essential oil within amylose nanostructures as a natural antimicrobial in food applications. *Starch-Stärke*. **2021**;73(7-8):2100021.
- Andrés-Bello** A, Barreto-Palacios VI, García-Segovia P, Mir-Bel J, Martínez-Monzó J. Effect of pH on color and texture of food products. *Food Eng*. **2013**;5:1-13.
- Aranaz** I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Heras Caballero A, Acosta N. Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*. **2021**;13(19):3256.

- Atarés L, Chiralt A.** Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci Technol.* **2016**;48:51-62.
- Aztatzi-Ruggerio L, Granados-Balbuena SY, Zainos-Cuapio Y, Ocaranza-Sánchez E, Rojas-López M.** Analysis of the degradation of betanin obtained from beetroot using Fourier transform infrared spectroscopy. *JFST.* **2019**;56:3677-86.
- Balbinot-Alfaro E, Craveiro DV, Lima KO, Costa HL, Lopes DR, Prentice C.** Intelligent packaging with pH indicator potential. *Food Eng Rev.* **2019**;11:1-10.
- Benites Quilca HP.** Comparación de los solventes agua y etanol en la extracción de betalainas a partir de las brácteas de Buganvilla (*Bougainvillea Glabra* Ch.). Universidad Nacional Del Centro Del Perú. **2015**:1-91.
- Barkociová M, Tóth J, Sutor K, Drobnicka N, Wybraniec S, Dudík B, Bilková A, Czigle S.** Betalains in Edible Fruits of Three Cactaceae Taxa—Epiphyllum, Hylocereus, and Opuntia—Their LC-MS/MS and FTIR Identification and Biological Activities Evaluation. *Plants.* **2021**;10(12):2669.
- Basavegowda N, Baek KH.** Synergistic antioxidant and antibacterial advantages of essential oils for food packaging applications. *Biomol.* **2021**;11(9):1267.
- Bermúdez-Vásquez MJ, Granados-Chinchilla F, Molina A.** Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana.* **2019**;30:47-63.
- Bhargava N, Sharanagat VS, Mor RS, Kumar K.** Active and intelligent biodegradable packaging films using food and food waste-derived bioactive compounds: A review. *Trends Food Sci Technol.* **2020**;105:1-54.
- Bhavaniramy S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D.** Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *GOST.* **2019**;2(2):1-7.
- Bintsis T.** Foodborne pathogens. *AIMS microbiol.* **2017**;3:529.
- Bourtoom T, Chinnan MS.** Preparation and properties of rice starch–chitosan blend biodegradable film. *LWT-Food science and Technology.* **2008**;41(9):1633-41.
- Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK.** Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioproc Tech.* **2011**;4:1-27.

- Čanadanović-Brunet** JM, Savatović SS, Četković GS, Vulić JJ, Djilas SM, Markov SL, Cvetković DD. Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts. *Czech J Food Sci.* **2011**;29(6):1-11.
- Castro** Miranda AG, Lopez Martinez LX. Efecto del procesamiento térmico sobre el contenido de betalainas y la actividad antioxidante del betabel (*Beta vulgaris* L.). **2014**.
- Cazorla García** JG. Aplicación de la técnica de microencapsulación de betalaínas extraídas a partir de la remolacha (*Beta vulgaris*) (Master's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Maestría en Tecnología de Alimentos). **2018**.
- Cejudo-Bastante** MJ, Hurtado N, Mosquera N, Heredia FJ. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. *Food Res Int.* **2014**;64:465-71.
- Chen** RH, Lin JH, Yang MH. Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. *Carbohydr Polym.* **1994**;24(1):41-6.
- Chellapandi** P, Prisilla A. Clostridium botulinum type A-virulome-gut interactions: a systems biology insight. *Hum Microbiome J.* 2018 Apr 1;7:15-22.
- Chung** YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JG, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin.* **2004**;25(7):932-6.
- Cisowska** A, Wojnicz D, Hendrich AB. Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat Prod Commun.* **2011**;6:149-156.
- Cortés** Tapia CP. Envases inteligentes. Universidad Andrés Bello. **2017**:1-131.
- de Medeiros Barbosa** I, da Costa Medeiros JA, de Oliveira KÁ, Gomes-Neto NJ, Tavares JF, Magnani M, de Souza EL. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. *Food control.* **2016**;59:1-10.

- Colussi R**, Pinto VZ, El Halal SL, Biduski B, Prietto L, Castilhos DD, da Rosa Zavareze E, Dias AR. Acetylated rice starches films with different levels of amylose: Mechanical, water vapor barrier, thermal, and biodegradability properties. *Food chem.* **2017**;221:1614-20.
- Coy-Barrera E**. Analysis of betalains (betacyanins and betaxanthins). *Recent advances in natural products analysis*. Elsevier. 2020:593-619.
- Czyżowska A**, Klewicka E, Libudzisz Z. The influence of lactic acid fermentation process of red beet juice on the stability of biologically active colorants. *Eur Food Res Technol.* **2006**;223:110-6.
- de Benito LF**. Diseño de un recubrimiento activo comestible reforzado con partículas de sílice y su aplicación en queso panela. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro). **2021**.
- de Britto D**, Assis OB. Hydrophilic and morphological aspects of films based on quaternary salts of chitosan for edible applications. *Packag Technol Sci.* **2010**;23(2):111-9.
- Duboust N**, Ghadbeigi H, Pinna C, Ayvar-Soberanis S, Collis A, Scaife R, Kerrigan K. An optical method for measuring surface roughness of machined carbon fibre-reinforced plastic composites. *J Compos Mater.* **2017**;51(3):289-302.
- Detduangchan N**, Sridach W, Wittaya T. Enhancement of the properties of biodegradable rice starch films by using chemical crosslinking agents. *Int Food Res J.* **2014**;21(3).
- Devadiga D**, Ahipa TN. Betanin: A Red-Violet Pigment-Chemistry and Applications. *Chemistry and Technology of Natural and Synthetic Dyes and Pigments.* **2020**;10:1-19.
- Dilkes-Hoffman LS**, Lane JL, Grant T, Pratt S, Lant PA, Laycock B. Environmental impact of biodegradable food packaging when considering food waste. *J Clean Prod.* **2018**;180:325-334.
- Dumbravă A**, Enache I, Oprea CI, Georgescu A, Gîrțu MA. TOWARD A MORE EFFICIENT UTILISATION OF BETALAINS AS PIGMENTS FOR DYE-SENSITIZED SOLAR CELLS. *DJNB.* **2012**;7(1).

- Dutta** PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chem.* **2009**;114(4):1173-82.
- El-Saadony** MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed AE, Alshammari FA, Abd El-Hack ME. The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview. *Poult Sci.* **2022**;101:101716.
- Embuscado** ME, Huber KC. *Edible films and coatings for food applications.* New York, NY, USA. Springer; **2009**:211-244.
- Escamilla-García** M, García-García MC, Gracida J, Hernández-Hernández HM, Granados-Arvizu JÁ, Di Pierro P, Regalado-González C. Properties and biodegradability of films based on cellulose and cellulose nanocrystals from corn cob in mixture with chitosan. *Int J Mol Sci.* **2022**;23:10560.
- Escamilla-Garcia** M, Reyes-Basurto A, Garcia-Almendarez BE, HernándezHernández E, Calderón-Domínguez G, Rossi-Marquez G, Regalado-Gonzalez C. Modified starch-chitosan edible films: Physicochemical and mechanical characterization. *Coatings.* **2017**;7:1-15.
- Escamilla-García** M, Ríos-Romo RA, Melgarejo-Mancilla A, Díaz-Ramírez M, Hernández-Hernández HM, Amaro-Reyes A, Pierro PD, Regalado-González C. Rheological and antimicrobial properties of chitosan and quinoa protein filmogenic suspensions with thyme and rosemary essential oils. *Foods.* **2020**;9(11):1616.
- Escobar Guadarrama** JA. Elaboración y caracterización de biopelículas elaboradas con quitosano y adicionadas con partículas de almidón. **2020**.
- Esquivel** P. Betalains. In *Handbook on natural pigments in food and beverages.* Woodhead Publ. **2016**:81-99.
- Ezati** P, Rhim JW. Starch and agar-based color-indicator films integrated with shikonin for smart packaging application of shrimp. *Food Sci Technol.* **2021**;1:19631969.
- Fan** Z, Xie J, Li Y, Wang H. Listeriosis in mainland China: a systematic review. *IJID.* **2019**;81:17-24.

- Fernandez** CM, Alves J, Gaspar PD, Lima TM, Silva PD. Innovative processes in smart packaging. A systematic review. *J Sci Food Agric.* **2022**;1:1-18.
- Fernández del Campo** S. Enfermedades de transmisión alimentaria de origen bacteriano. Universidad de Cantabria. **2021**.
- Fernández-López** JA, Angosto JM, Giménez PJ, León G. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum Nutr.* **2013**;68:11-7.
- Fernando** GS, Wood K, Papaioannou EH, Marshall LJ, Sergeeva NN, Boesch C. Application of an ultrasound-assisted extraction method to recover betalains and polyphenols from red beetroot waste. *ACS Sustain Chem Eng.* **2021**;9:8736-8747.
- Firouz** MS, Mohi-Alden K, Omid M. A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. *Int Food Res J.* **2021**;141:1-24.
- Fonseca-García** A, Jiménez-Regalado EJ, Aguirre-Loredo RY. Preparation of a novel biodegradable packaging film based on corn starch-chitosan and poloxamers. *Carbohydr Polym.* **2021**;251:1-8.
- Fuentes Carrillo** AC. Propuesta para el aprovechamiento de escamas de pescado aplicado a la producción de papel de quitosano por el método de desacetilación de quitina en medio alcalino (Tesis de licenciatura, Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América). **2021**.
- Gaona-Sánchez** VA, Calderon-Dominguez G, Morales-Sanchez E, Chanona-Perez JJ, Velazquez-De La Cruz G, Mendez-Mendez JV, Terrés-Rojas E, Farrera-Rebollo RR. Preparation and characterisation of zein films obtained by electrospraying. *Food Hydrocoll.* **2015**;49:1-0.
- García** MA, Pinotti A, Zaritzky NE. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. *Starch-Stärke.* **2006**;58(9):453-63.
- García Rincón** J. Efecto del Quitosano sobre la membrana celular de *Rhizopus stolonifer*. (Tesis de maestría en ciencias, Instituto Politécnico Nacionalb). **2008**.

- Gómez D**, Azón E, Marco N, Carramiñana JJ, Rota C, Ariño A, Yangüela J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food microbiol.* **2014**;42:61-65.
- Guardiola San Román T**. Antimicrobianos naturales presentes en colorantes alimentarios. Universitat Politècnica De València. **2020**:1-27.
- Guo L**, Wang Y, Bi X, Duo K, Sun Q, Yun X, Zhang Y, Fei P, Han J. Antimicrobial activity and mechanism of action of the *Amaranthus tricolor* crude extract against *Staphylococcus aureus* and potential application in cooked meat. *Foods.* **2020**;9:359.
- Gupta P**, Toksha B, Rahaman M. A review on biodegradable packaging films from vegetative and food waste. *Chem Rec.* **2022**:1-37.
- Hagenmaier RD**, Baker RA. Wax microemulsions and emulsions as citrus coatings. *J Agr Food Chem.* 1994;42(4):899-902.
- Haider Z**, Anjum Nawab FA, Lutfi Z, Hasnain A. The effect of rice husk based ethylene scavengers on the postharvest quality of tomato fruits. *Int J Biol Biotech.* **2020**;17:765-775.
- Halloub A**, Raji M, Essabir H, Nekhlaoui S, Bensalah MO, Bouhfid R. Stable smart packaging betalain-based from red prickly pear covalently linked into cellulose/alginate blend films. *Int J Biol Macromol.* **2023**;234:123764.
- Halwani AF**, Sindi HA, Jambi HA. Characterization of physical properties of red beet pigments. *J Biochem Technol.* **2018**;9:1-5.
- Hasan M**, Rusman R, Khaldun I, Ardana L, Mudatsir M, Fansuri H. Active edible sugar palm starch-chitosan films carrying extra virgin olive oil: Barrier, thermo-mechanical, antioxidant, and antimicrobial properties. *Int J Biol Macromol.* **2020**;163:766-75.
- Hashim MA**, Yahya F, Hamzah Y, Wan Aida WM, Khalid KH. Structural characterization, citral retention and thermal properties of the inclusion complex of rice starch/lemongrass extract. *Food Res J.* **2020**;4(3):873-86.

- Herbach** KM, Stintzing FC, Carle R. Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *J Food Sci.* **2006**;71:41-50.
- Herbach** KM, Stintzing FC, Carle R. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J Food Sci.* **2004**;69:491-8.
- Hernández-González** M. Evaluación de la migración de los componentes de un bioempaque activo: Polisuccinimida-Aceite Esencial de Orégano. *Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos.* **2019**;2:1-5.
- Hernández-Hernández** E, Regalado-González C, Vázquez-Landaverde P, Guerrero-Legarreta I, García-Almendárez BE. Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* HBK) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *Sci World J.* **2014**;2014:1-13.
- Herrmann** C, Rhein S, Sträter KF. Consumers' sustainability-related perception of and willingness-to-pay for food packaging alternatives. *Resour Conserv Recycl.* **2022**;181:1-13.
- Hidayat** SH, Dirpan A, Djalal M, Rahman AN, Ainani AF. Sensitivity determination of indicator paper as smart packaging elements in monitoring meat freshness in cold temperature. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci.* **2019**;343:1-5.
- Hosseini** SF, Rezaei M, Zandi M, Ghavi FF. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food chem.* **2013**;136(3-4):1490-5.
- Huntrakul** K, Yoksan R, Sane A, Harnkarnsujarit N. Effects of pea protein on properties of cassava starch edible films produced by blown-film extrusion for oil packaging. *Food Packag Shelf life.* **2020**;24:1-11.
- Iguasnia Ureta** AA. Técnicas utilizadas para la conservación de frutas y vegetales mediante biopelículas a partir de matrices poliméricas naturales (Tesis de licenciatura, Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo). **2021**.
- İncili** GK, Akgöl M, Aydemir ME, Alan S, Mutlu M, İlhak Oİ, Öksüztepe G. Fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in homemade marinade and on marinated chicken drumsticks, wings and breast meat. *LWT.* **2020**;134:1-7.

- Jadhav** RV, Bhujbal SS, Jadhav RV. A review on natural food colors. *Pharmaceutical Resonance*. **2020**;2(2):12-20.
- Jaworska** M, Sakurai K, Gaudon P, Guibal E. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. *Polym Int*. **2003**;52:198-205.
- Jiang** Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YG, Liu XL. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ toxicol and pharmacol*. **2011**;32:63-8.
- Jridi** M, Hajji S, Ayed HB, Lassoued I, Mbarek A, Kammoun M, Souissi N, Nasri M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *Int J Biol Macromol*. **2014**;67:373-9.
- Kan** J, Liu J, Yong H, Liu Y, Qin Y, Liu J. Development of active packaging based on chitosan-gelatin blend films functionalized with Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruit extract. *Int J Biol Macromol*. **2019**;140:384-92.
- Kaur** S, Kaur N, Aggarwal P, Grover K. Bioactive compounds, antioxidant activity, and color retention of beetroot (*Beta vulgaris* L.) powder: Effect of steam blanching with refrigeration and storage. *J Food Process Preserv*. **2021**;45(3):e15247.
- Kaur** S, Kaur N, Aggarwal P, Grover K. Sensory attributes, bioactive compounds, antioxidant activity and color values of jam and candy developed from Beetroot (*Beta vulgaris* L.). *J Appl Nat* **2022**;14(2):459-68.
- Keceli** TM, Erginkaya Z, Turkkan E, Kaya U. Antioxidant and antibacterial effects of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis* strains. *Asian J Chem*. **2013**;25:1-5.
- Kumar** L, Ramakanth D, Akhila K, Gaikwad KK. Edible films and coatings for food packaging applications: A review. *Environ Chem Lett*. **2021**:1-26.
- Khan** MI, Liu J. Plant betalains: Recent applications in food freshness monitoring films. *Food Packag*. **2022**;34:100921.
- Kottaridis** S. *Recovery of added value compounds from beetroot juice industry wastes* (Tesis de Doctorado, Lancaster University, Reino Unido). **2020**.

- Kuswandi** B, Asih NP, Pratoko DK, Kristiningrum N, Moradi M. Edible pH sensor based on immobilized red cabbage anthocyanins into bacterial cellulose membrane for intelligent food packaging. *Packag Technol Sci*.
- Liang** Z, Wu B, Fan P, Yang C, Duan W, Zheng X, Liu C, Li S. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chem.* **2008**;111:837-844.
- Liu** H, Adhikari R, Guo Q, Adhikari B. Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch–chitosan films. *J Food Eng.* **2013**;116(2):588-97.
- Liu** Z, Lin D, Lopez-Sanchez P, Yang X. Characterizations of bacterial cellulose nanofibers reinforced edible films based on konjac glucomannan. *Int J Biol Macromol.* **2020**;145:634-645.
- López-Mata** MA, Ruiz-Cruz S, Silva-Beltrán NP, Ornelas-Paz JD, Zamudio-Flores PB, Burrueal-Ibarra SE. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules.* **2013**;18(11):13735-53.
- Mahcene** Z, Khelil A, Hasni S, Bozkurt F, Goudjil MB, Tornuk F. Home-made cheese preservation using sodium alginate based on edible film incorporating essential oils. *J Food Sci Technol.* **2021**;58:1-14.
- Mataragas** M, Bikouli VC, Korre M, Sterioti A, Skandamis PN. Development of a microbial time temperature indicator for monitoring the shelf life of meat. *IFSET.* **2019**;52:89-99.
- Mathew** S, Abraham TE. Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films. *Food hydrocoll.* **2008**;22(5):826-35.
- Mehboob** S, Ali TM, Sheikh M, Hasnain A. Effects of cross linking and/or acetylation on sorghum starch and film characteristics. *Int J Biol Macromol.* **2020**;155:786794.
- Mirzai** M, Asadabadi S. Magnetic Nanocomposites Containing Low and Medium Molecular Weight Chitosan for Dye Adsorption: Hydrophilic property versus functional groups. *J Polym Environ.* **2022**;30:1-37.

- Mishra** AP, Devkota HP, Nigam M, Adetunji CO, Srivastava N, Saklani S, Shukla I, Azmi L, Shariati MA, Coutinho HD, Khaneghah AM. Combination of essential oils in dairy products: A review of their functions and potential benefits. *LWT*. **2020**;133:110.
- Mohamed** RR, Elella MH, Sabaa MW. Synthesis, characterization and applications of N-quaternized chitosan/poly (vinyl alcohol) hydrogels. *Int J Biol Macromol*. **2015**;80:149-61.
- Mohamed** SA, El-Sakhawy M, El-Sakhawy MA. Polysaccharides, protein and lipidbased natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydr Polym*. **2020**;238:1-45.
- Moon** SH, Waite-Cusic J, Huang E. Control of Salmonella in chicken meat using a combination of a commercial bacteriophage and plant-based essential oils. *Food Control*. **2020**;110:1-23.
- Musso** YS, Salgado PR, Mauri AN. Smart gelatin films prepared using red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extracts as solvent. *Food Hydrocoll*. **2019**;89:674-81.
- Musso** YS. Desarrollo de películas proteicas para el envasado activo e inteligente de alimentos. Universidad Nacional de La Plata. **2017**.
- Nair** MS, Tomar M, Punia S, Kukula-Koch W, Kumar M. Enhancing the functionality of chitosan-and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *Int J Biol Macromol*. **2020**;164:304-320.
- Nakatsuka** T, Yamada E, Takahashi H, Imamura T, Suzuki M, Ozeki Y, Tsujimura I, Saito M, Sakamoto Y, Sasaki N, Nishihara M. Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. *Scientific reports*. **2013**;3(1):1970.
- Namazzadeh** G, Ehsani A, Ghasempour Z. Microencapsulation of red beet extract using chitosan-Persian gum complex coacervates. *J Food Process Preserv*. **2022**:17148.
- Nieto** G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*. **2018**;5:1-13.

- Nirmal NP, Mereddy R, Maqsood S.** Recent developments in emerging technologies for beetroot pigment extraction and its food applications. *Food Chem.* **2021**;356:129611.
- Nouairi ME, Freha M, Bellil A.** Study by absorption and emission spectrophotometry of the efficiency of the binary mixture (Ethanol-Water) on the extraction of betanin from red beetroot. *SAA.***2021**;260:119939.
- Ochoa TA, Almendárez BE, Reyes AA, Pastrana DM, López GF, Belloso OM, González CR.** Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food Bioproc Tech.* **2017**;10:103-14.
- Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SM.** Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food chem.* **2010**;122(1):161-6.
- Olivares-Marin IK, Madrigal-Perez LA, Canizal-Garcia M, García-Almendárez BE, González-Hernández JC, Regalado-Gonzalez C.** Interactions between carbon and nitrogen sources depend on RIM15 and determine fermentative or respiratory growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology.* **2018**;102:4535-48.
- Ospina Gallego DF, Gómez Quinto CA.** Análisis de las estrategias de prevención y control de enfermedades transmitidas por alimentos: Scoping review 2005-2020. *Universidad de Antioquia.* **2021**:1-72.
- Ozturk K, Arslan FB, Tavukcuoglu E, Esendagli G, Calis S.** Aggregation of chitosan nanoparticles in cell culture: Reasons and resolutions. *International Journal of Pharmaceutics.* **2020**;578:119119.
- Pavinatto A, de Almeida Mattos AV, Malpass AC, Okura MH, Balogh DT, Sanfelice RC.** Coating with chitosan-based edible films for mechanical/biological protection of strawberries. *Int J Biol Macromol.* **2020**;151:1004-1011.e
- Pelissari FM, Ferreira DC, Louzada LB, dos Santos F, Corrêa AC, Moreira FK, Mattoso LH.** Starch-based edible films and coatings: An eco-friendly alternative for food packaging. *Starches for food application.* **2019**:359-420.

- Peralta** J, Bitencourt-Cervi CM, Maciel VB, Yoshida CM, Carvalho RA. Aqueous hibiscus extract as a potential natural pH indicator incorporated in natural polymeric films. *Food Packag.* **2019**;19:47-55.
- Perdana** MI, Ruamcharoen J, Panphon S, Leelakriangsak M. Antimicrobial activity and physical properties of starch/chitosan film incorporated with lemongrass essential oil and its application. *Lwt.* **2021**;141:110934.
- Pérez** S. Informe científico de Beca de Perfeccionamiento (2015-2016). Universidad Nacional de Mar del Plata. **2016**:1-8.
- Pinzon** MI, Garcia OR, Villa CC. The influence of Aloe vera gel incorporation on the physicochemical and mechanical properties of banana starch-chitosan edible films. *J Sci Food Agr.* **2018**;98(11):4042-9.
- Pigott** DC. Foodborne illness. *Emerg Med Clin N Am.* **2008**;26:475-97.
- Popescu** V, Blaga AC, Pruneanu M, Cristian IN, Pîslaru M, Popescu A, Rotaru V, Crețescu I, Cașcaval D. Green chemistry in the extraction of natural dyes from colored food waste, for dyeing protein textile materials. *Polymers.* **2021**;13(22):3867.
- Posada** JC, Montes-Florez E. Revisión: materiales poliméricos biodegradables y su aplicación en diferentes sectores industriales. *Informador Técnico.* **2022**;86(1):94110.
- Righi Pessoa da Silva** H, da Silva C, Bolanho BC. Ultrasonic-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris* L.). *J Food Process Eng.* **2018**;41(6):12833.
- Ríos-de-Benito** LF, Escamilla-García M, García-Almendárez B, Amaro-Reyes A, Di Pierro P, Regalado-González C. Design of an Active Edible Coating Based on Sodium Caseinate, Chitosan and Oregano Essential Oil Reinforced with Silica Particles and Its Application on Panela Cheese. *Coatings.* **2021**;11:1-18.
- Rodrigues** C, Souza VG, Coelho I, Fernando AL. Bio-based sensors for smart food packaging—Current applications and future trends. *Sensors.* **2021**;21:1-23.

- Sebti I**, Martial-Gros A, Carnet-Pantiez A, Grelier S, Coma V. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *J Food Sci.* **2005**;70:1-5.
- Rodríguez-González C**, Salas P, López-Marín LM, Millán-Chiu B, De La Rosa E. Hydrothermal synthesis of graphene oxide/multiform hydroxyapatite nanocomposite: its influence on cell cytotoxicity. *Mater Res Express* **2018**;5(12):125023.
- Ruiz-Gómez MA**, Rodríguez-Gattorno G, Figueroa-Torres MZ, Obregón S, Tehuacanero-Cuapa S, Aguilar-Franco M. Role of assisting reagents on the synthesis of α -Fe₂O₃ by microwave-assisted hydrothermal reaction. *J Mater Sci Mater Electron.* **2021**;32(7):9551-66.
- Ryder K**, Ali MA, Carne A, Billakanti J. The potential use of dairy by-products for the production of nonfood biomaterials. *Crit Rev Environ Sci Technol.* **2017**;47:621-42.
- Sadowska-Bartosz I**, Bartosz G. Biological properties and applications of betalains. *Molecules.* **2021**;26(9):2520.
- Samprasit W**, Akkaramongkolporn P, Jaewjira S, Opanasopit P. Design of alpha mangostin-loaded chitosan/alginate controlled-release nanoparticles using genipin as crosslinker. *J Drug Deliv Sci Technol.* **2018**;46:312-21.
- 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 hydrocoll.* **2015**;49:89-94.
- Shariatnia Z**, Fazli M. Mechanical properties and antibacterial activities of novel nanobiocomposite films of chitosan and starch. *Food Hydrocoll.* **2015**;46:112-24.
- Sharma K**, Guleria S, Razdan VK, Babu V. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Ind Crops Prod.* **2020**;154:112569.
- Shi L**, Zhou J, Guo J, Gladden I, Kong L. Starch inclusion complex for the encapsulation and controlled release of bioactive guest compounds. *Carbohydr Polym.* **2021**;274:118596.

- Sigwela V**, De Wit M, du Toit A, Osthoff G, Hugo A. Bioactive betalain extracts from cactus pear fruit pulp, beetroot tubers, and amaranth leaves. *Molecules*. **2021**;26(16):5012.
- Singh A**, Ganesapillai M, Gnanasundaram N. Optimizaton of extraction of betalain pigments from beta vulgaris peels by microwave pretreatment. *Mater Sci Eng*. **2017**;263:032004).
- Sofi SA**, Singh J, Rafiq S, Ashraf U, Dar BN, Nayik GA. A comprehensive review on antimicrobial packaging and its use in food packaging. *Curr Nutr Food Sci*. **2018**;14:305-312.
- Solano-Doblado LG**, Alamilla-Beltrán L, Jiménez-Martínez C. Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. **2018**;21:1-14.
- Souza VG**, Pires JR, Vieira ÉT, Coelho IM, Duarte MP, Fernando AL. Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: From in vitro assays to application in fresh poultry meat. *Food Hydrocoll*. **2019**;89:241-52.
- Suvarna V**, Nair A, Mallya R, Khan T, Omri A. Antimicrobial nanomaterials for food packaging. *Antibiotics*. **2022**;11:729.
- Tenore GC**, Novellino E, Basile A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *JFF*. **2012**;4(1):129-36.
- Thakur R**, Saberi B, Pristijono P, Stathopoulos CE, Golding JB, Scarlett CJ, Bowyer M, Vuong QV. Use of response surface methodology (RSM) to optimize pea starch–chitosan novel edible film formulation. *JFST*. **2017**;54:2270-8.
- Tohidi B**, Rahimmalek M, Trindade H. Review on essential oil, extracts composition, molecular and phytochemical properties of *Thymus* species in Iran. *Ind Crops Prod*. **2019**;134:89-99.
- Torres-Alvarez C**, Castillo S, Sánchez-García E, Aguilera Gonzalez C, Galindo-Rodríguez SA, Gabaldón-Hernández JA, Báez-González JG. Inclusion complexes of concentrated orange oils and β -cyclodextrin: Physicochemical and biological characterizations. *Molecules*. **2020**;25(21):5109.

- Tsironi M, Kosma IS, Badeka AV.** The effect of whey protein films with ginger and rosemary essential oils on microbiological quality and physicochemical properties of minced lamb meat. *Sustainability*. **2022**;14:1-15.
- Ubaque Beltrán CA.** Inclusión de aceite esencial de orégano y nisina encapsulados en biorecubrimiento comestible a partir de quitosano como alternativa de conservación en carne de hamburguesa de res. Universidad Nacional de Colombia. **2020**.
- US Food and Drug Administration.** CFR-code of federal regulations title 21. 21 CFR 170.39 Revised as of April 1, 1997. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=170.39>
- Ushigua Sadva JD.** Estudio de factibilidad en la implementación de una planta de producción de una pomada terapéutica antiinflamatoria a base de aceite esencial de cáñamo (*Cannabis sativa*), aceite esencial de romero (*Salvia rosmarinus*) y aceite esencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) en el cantón Ambato de la provincia de Tungurahua. Universidad Técnica de Ambato. **2021**:1-138.
- Valdez-Valdez BA.** Efecto de un bioempaquete eco-friendly con características antimicrobianas y antioxidantes a base de fibra de cítricos y extracto de orégano, sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de *Cyprinus carpio*. Universidad Autónoma Del Estado De México. **2018**:1-156.
- Valencia GA.** Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Revista Scientia Agroalimentaria*. **2015**;2.
- Vargas P.** Evaluación de la eficiencia de conversión fotovoltaica de celdas solares tipo Grätzel usando betalaínas extraídas y separadas de fuentes naturales. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Zacatecas). **2020**.
- Vásconez MB, Flores SK, Campos CA, Alvarado J, Gerschenson LN.** Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Res Int*. **2009**;42(7):762-9.

- Vázquez-Luna A**, Santiago M, Rivadeneyra-Domínguez E, Díaz-Sobac R. Películas comestibles a base de almidón nanoestructurado como material de barrera a la humedad. *CienciaUAT*. **2019**;13:152-64.
- Venkatachalam K**, Rakkapao N, Lekjing S. Physicochemical and antimicrobial characterization of chitosan and native glutinous rice starch-based composite edible films: Influence of different essential oils incorporation. *Membranes*. **2023**;13(2):161.
- Wahidin M**, Srimarlita A, Sulaiman I, Indarti E. Transparency and thickness of jackfruit and durian seed starch edible film. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*. **2021**:1-7.
- Wang H**, Ding F, Ma L, Zhang Y. Edible films from chitosan-gelatin: Physical properties and food packaging application. *Food Bioscience*. **2021**;40:1-17.
- Weerasooriya G**, Khan S, Chousalkar KK, McWhorter AR. Invasive potential of sublethally injured *Campylobacter jejuni* and *Salmonella Typhimurium* during storage in chicken meat juice. *Food Control*. **2022**;135:1-13.
- Wrona M**, Nerín C. Analytical approaches for analysis of safety of modern food packaging: A review. *Molecules*. **2020**;25:1-18.
- Xu P**, Bajaj G, Shugg T, Van Alstine WG, Yeo Y. Zwitterionic chitosan derivatives for pH-sensitive stealth coating. *Biomacromolecules*. **2010**;11(9):2352-8.
- Xu YX**, Kim KM, Hanna MA, Nag D. Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. *Ind Crops Prod*. **2005**;21(2):185-92.
- Yap PS**, Yusoff K, Lim SH, Chong CM, Lai KS. Membrane disruption properties of essential oils—A double-edged sword?. *Processes*. **2021**;9(4):595.
- Yeddes W**, Nowacka M, Rybak K, Younes I, Hammami M, Saidani-Tounsi M, Witrowa-Rajchert D. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of rosemary essential oils as gelatin edible film component. *Food Sci Technol Res*. **2019**;25:321-329.
- Yuan L**, Feng W, Zhang Z, Peng Y, Xiao Y, Chen J. Effect of potato starch-based antibacterial composite films with thyme oil microemulsion or microcapsule on shelf life of chilled meat. *LWT*. **2021**;139:1-7.

- Zamudio-Flores** PB, Torres AV, Salgado-Delgado R, Bello-Pérez LA. Influence of the oxidation and acetylation of banana starch on the mechanical and water barrier properties of modified starch and modified starch/chitosan blend films. *J Appl Polym Sci.* **2010**;115(2):991-8.
- Zhang** H, Que F, Xu B, Sun L, Zhu Y, Chen W, Ye Y, Dong Q, Liu H, Zhang X. Identification of *Listeria monocytogenes* contamination in a ready-to-eat meat processing plant in China. *Front in Microbiol.* **2021**;12:1-8.
- Zhang** X, Zou W, Xia M, Zeng Q, Cai Z. Intelligent colorimetric film incorporated with anthocyanins-loaded ovalbumin-propylene glycol alginate nanocomplexes as a stable pH indicator of monitoring pork freshness. *Food Chem.* **2022**;368:1-9.
- Zin** MM, Borda F, Márki E, Bánvölgyi S. Betalains, total polyphenols, and antioxidant contents in red beetroot peel (*Cylindra* type). *Prog Agric Eng Sci.* **2021**;16:27-36.
- Zitz** U, Zunabovic M, Domig KJ, Wilrich PT, Kneifel W. Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*. *J Food Protection.* **2011**;74:1-6.
- Zuo** G, Song X, Chen F, Shen Z. Physical and structural characterization of edible bilayer films made with zein and corn-wheat starch. *J Saudi Soc Agric Sci.* **2019**;18(3):324-31.