



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES**

**DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA ACTIVA, QUE AUMENTE LA  
VIDA DE ANAQUEL EN CARNE DE BOVINO**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES**

**PRESENTA:**

**M. en C. ENRIQUE DANIEL ARCHUNDIA VELARDE**

Toluca, Estado de México, Noviembre de 2019



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES**

**DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA ACTIVA, QUE AUMENTE LA  
VIDA DE ANAQUEL EN CARNE DE BOVINO**

# **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES

**PRESENTA:**

**M. en C. ENRIQUE DANIEL ARCHUNDIA VELARDE**

**ASESORES**

**DRA. MARÍA DOLORES MARIEZCURRENA BERASAIN**

**DRA. DORA LUZ PINZÓN MARTÍNEZ**

**DR. ABDEL-FATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM**

Toluca, Estado de México, Noviembre de 2019

## Resumen

La carne es esencial en la alimentación humana por su calidad nutricional. Sin embargo, es un producto degradable por oxígeno y microorganismos, los cuales, ponen en riesgo la calidad e inocuidad del alimento. De ahí la importancia de ocupar empaques plásticos que muestren y protejan éste tipo de productos. Sin embargo, los convencionales son altamente contaminantes por su baja degradación. Por ello en la actualidad se han desarrollado las denominadas biopelículas activas de fácil degradación y que confieren actividad antimicrobiana y antioxidante. Así, el objetivo de la investigación es desarrollar y caracterizar una biopelícula activa con desechos agroindustriales, que mejore las características fisicoquímicas y de inocuidad en la vida útil de carne bovina. Para ello se usó un diseño experimental factorial 3x3 entre tres concentraciones (etanol:agua 20:80, 50:50, 80:20 v/v) y tres residuos (hojas: guayaba aguacate y ciruelo). El resultado indicó que las mayores concentraciones las presentó la interacción 50:50 v/v (etanol/agua) con la hoja de guayaba (fenoles totales=111.7±8.8 mg GAE/g MS, saponinas =88.5±6.92 mg/g MS y Actividad antioxidante=450.3±18 µM TEAC/g MS). Posteriormente, se realizaron pruebas de capacidad antimicrobiana, donde solamente muestra inhibición el extracto de hojas de guayaba en contra de 8 microorganismos patógenos evaluados mostrando una capacidad mínima inhibitoria en un rango 0.62-1.25 mg/ml. Con estos resultados se realizaron biopelículas (Gelatina-quitosano) con y sin extracto de guayaba, las cuales fueron caracterizadas midiendo propiedades ópticas y mecánicas,

permeabilidad, así como su morfología y propiedades térmicas. Encontrando como resultado que ambas muestran en general buenas propiedades plásticas., en cuanto al efecto que causo la adición del extracto se observan que no efecto las propiedades de grosor, elongación, módulo de Young, permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, así como la morfología, ni sus propiedades térmicas como TGA y DSC., ya que se muestran similares a las biopelículas sin extracto, En contraparte a esto la adición del extracto si mostro diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en resistencia a la tensión, donde se observa una disminución en este valor, así como un efecto visible en las imágenes SEM de la presencia y distribución homogénea de las micelas del extracto y las cuales se sugieren le brindan a las biopelículas un efecto benéfico bioactivo en la vida útil de carne bovina manteniendo la inocuidad y características fisicoquímica de la carne por un lapso mayor de tiempo.

**Palabras claves** Biopelículas, Extractos hidroalcohólicos, carne bovina, vida útil del producto.

## **ABSTRACT**

Meat is essential for human food by its nutritional quality. However, it is an oxygen and microorganisms degradable product, which risk the food quality and safety. Then plastic packaging has been important because they protect and show them. Nevertheless, conventional packaging are highly polluting due to their low degradability. Actually, easy degradable and active edible coats have been developed that present antimicrobial and antioxidant activities. Then the main objective for the present research was to develop and characterize an active edible coat made by agroindustrial waste in order to improve meat physicochemical and innocuous characteristics during shelf life. A 3 X 3 factorial experimental design was used for the three concentrations proved (Ethanol:water 20:80, 50:50 and 80:20 v/v) and three agroindustrial waste (guava, avocado and plum leaves).

Guava leaves 50:50 v/v ethanol:water extract presented the highest results for total phenol ( $111.7 \pm 8.8$  mg GAE/g DM), saponins ( $88.5 \pm 6.92$  mg/g DM) and antioxidant capacity ( $450.3 \pm 18$   $\mu$ M TEAC/g DM). At that moment, antimicrobial capacity tests were made and guava leaves extract presented activity over eight pathogen microorganisms proved. Minimal inhibitory capacity shown was 0.62-1.25 mg/mL. According to those results edible coats were performed (Chitosan-gelatine) with and without guava extracts and optical and mechanical characterization as permeability and thermal properties and morphology were made. Both edible coats (with and without extracts) presented good plastic properties and plant extract did not affect

thickness, elongation and Young module, water stream and oxygen permeability together with morphology and TGA and DSC thermal properties. In the other hand, guava extract affected the tension resistance, where a decrease was observe. A visible effect on extract micelles presence and distribution SEM pictures were observed; furthermore, they are responsible that edible coats became active and increase bovine meat shelf life by improving its food safety innocual and physicochemical.

Keywords: Biofilms, Hydroalcoholic extracts, Meat beef, shelf life.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma del Estado de México, así como a la Facultad de Ciencias Agrícolas por las facilidades brindadas para realizar esta investigación.

A el “Laboratorio de Microbiología” a cargo de la Dra. Patricia G. Mendoza García perteneciente a la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Tecnológico de Veracruz por las facilidades brindadas para realizar parte de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada de manutención, para poder hacer posible esta investigación.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y tecnología por el apoyo otorgado para poder hacer posible esta investigación.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	La carne	1
1.2	La carne bovina	1
1.2.1	Importancia económica de la carne bovina en México	1
1.2.2	Características nutrimentales de la carne	2
1.2.3	Calidad de la carne	4
1.2.4	Características sensoriales de la carne	5
1.2.5	Características fisicoquímicos de la carne	6
1.2.6	Color en la carne	6
1.2.7	La vida útil de la carne	6
1.2.8	Oxidación de la carne fresca	7
1.2.9	La oxidación y los agentes oxidantes	7
1.2.10	Radicales libres en la carne	8
1.2.11	Microorganismos en carne fresca	9
1.3	Principales microorganismos que causan enfermedades de transmisión por alimentos	10
1.3.1	<i>Escherichia coli</i> O157; H7	11
1.3.2	<i>Salmonella</i>	12
1.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.4	Conservación de alimentos	15
1.4.1	Conservación de alimentos cárnicos	16
1.4.2	Envasado	17
1.4.3	Envasado de carne fresca	19
1.4.4	Componentes naturales aplicados a envases cárnicos	19
1.5	Envases plásticos	20
1.5.1	Problemáticas de los envases plásticos	21
1.6	Bioplásticos	23
1.6.1	Biopelícula	24
1.6.2	Recubrimiento plástico	24
1.6.3	Biopelículas y recubrimientos en alimentos	24
1.6.4	Componentes para la formación de biopelículas o recubrimientos	25
1.6.5	Secado en placa ( <i>casting</i> )	25
1.6.6	Principales bases poliméricas de bioplásticos	26
1.6.7	Hidrocoloides	26
1.6.8	Principales bases poliméricas de bioplásticos	27
1.6.8.1	Polisacáridos	27
1.6.8.2	Quitosano	28
1.6.8.3	Proteínas	30
1.6.8.4	Gelatina	33



1.6.8.4.1	Propiedades fisicoquímicas de la gelatina que determinan su uso en biopelículas.....	35
1.6.8.4.1.1	Fuerza del gel ( <i>bloom</i> ).....	35
1.6.8.4.1.2	Solubilidad.....	36
1.6.8.4.1.3	Viscosidad.....	37
1.6.8.4.1.4	Punto de fusión.....	37
1.6.8.4.1.5	Punto de ajuste.....	37
1.6.8.4.2	Gelatina de residuos animales terrestres .....	38
1.6.8.4.3	Gelatina de residuos de la pesca .....	38
1.6.8.4.4	Gelatina de insectos .....	40
1.6.8.5	Lípidos.....	41
1.6.8.6	Surfactantes .....	42
1.6.8.6.1	Tween 80 y Tween 60 .....	42
1.6.8.7	Plastificante.....	42
1.6.9	Empaque activo.....	43
1.6.9.1	Principales métodos de caracterización de biopelículas.....	44
1.6.9.1.1	Propiedades Mecánicas .....	44
1.6.9.2	Propiedades ópticas de biopelículas.....	46
1.6.9.3	Transparencia .....	47
1.6.9.4	Propiedades de barrera a los gases .....	48
1.6.9.5	Propiedades de barrera al oxígeno.....	48
1.6.9.6	Propiedades de barrera al vapor de agua .....	49
1.6.9.7	Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las biopelículas .....	50
1.6.9.8	La Termogravimetría.....	51
1.6.9.9	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	52
1.6.10	Principales sustancias de las plantas que le dan actividad antimicrobiana o antioxidante .....	53
1.6.11	Capacidad antimicrobiana o antioxidante de productos vegetales naturales.....	53
1.6.11.1	Metabolitos.....	54
1.6.11.1.1	Metabolitos primarios.....	54
1.6.11.1.2	Metabolitos secundarios.....	55
1.6.11.1.2.1	Importancia industrial de los metabolitos secundarios.....	56
1.6.11.1.2.2	Clasificación de metabolitos secundarios.....	57
1.6.11.1.2.3	Flavonoides y compuestos fenólicos y polifenólicos aliados, .....	57
1.6.12	Propiedades de la hoja del árbol de guayaba.....	59
1.6.12.1	Capacidad antimicrobiana de hoja de guayaba.....	60
1.6.12.2	Capacidad antioxidante de hojas de guayaba .....	61
1.6.12.3	Composición de hojas de guayaba .....	61
1.6.13	Propiedades del árbol de Aguacate .....	62
1.6.13.1	Capacidad antimicrobiana de hojas de aguacate.....	63
1.6.14	Propiedades de las hojas del árbol de ciruela roja .....	63
1.6.15	Caracterización de compuestos bioactivos de residuos agroindustriales.....	64
1.6.15.1	Fenoles Totales por el método de Folin- Ciocalteu .....	64

1.6.15.2	Saponinas .....	64
1.6.15.3	Capacidad antioxidante .....	66
1.6.15.4	Principales métodos para medir capacidad antioxidante .....	66
1.6.15.4.1	Poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés (FRAP) .....	67
1.6.15.4.2	Depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	67
1.6.15.4.3.....	Depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico ABTS .....	68
1.6.15.5	Capacidad antimicrobiana .....	68
1.6.15.5.1	Mecanismos de acción de productos vegetales contra microorganismo .....	68
1.6.15.5.1.1	Capacidad inhibitoria en contra Bacterias Gram negativas: .....	69
1.6.15.5.1.2	Capacidad inhibitoria de Bacterias Gram positivas: .....	69
1.6.15.5.1.3	Método de Difusión en Agar .....	71
1.6.15.5.1.4	Método de Dilución en Agar .....	72
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>74</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>76</b>
4.1	Objetivo General .....	76
4.2	Objetivos Específicos.....	76
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
5.1	Sitio Experimental .....	77
5.2	Diseño Experimental.....	77
5.3	Caracterización de residuos agroindustriales .....	77
5.4	Desarrollo y caracterización de la biopelícula.....	78
5.5	Análisis de vida de anaquel de carne con biopelículas .....	79
5.6	Materiales .....	79
5.6.1	Residuos Agroindustriales (RA).....	79
5.6.2	Cuantificación de saponinas (SP) .....	81
5.6.3	Cuantificación de Fenoles Totales (PT) .....	82
5.6.4	Capacidad antioxidante (AC).....	84
5.6.5	Capacidad antimicrobiana por difusión en disco .....	85
5.6.6	Capacidad antimicrobiana mínima inhibitoria (CMI). .....	86
5.6.7	Elaboración de biopelículas de gelatina-quitosano.....	88
5.7	Caracterización de las biopelículas.....	89
5.7.1	Grosor de las biopelículas .....	89

5.7.2	Propiedades mecánicas de las biopelículas .....	90
5.7.3	Propiedades ópticas de las biopelículas .....	91
5.8	Color (L*, a* y b*) .....	91
5.8.1	Transparencia (T).....	92
5.8.2	Permeabilidad al vapor de agua (WVP) .....	92
5.8.3	Permeabilidad al oxígeno .....	94
5.8.4	Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	94
5.8.5	Análisis de termogravimetría (TGA) y análisis de Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	94
5.9	Vida útil de la carne en refrigeración.....	95
5.9.1	Análisis microbiológicos y fisicoquímicos.....	95
5.9.1.1	Mesófilos Aerobios y Psicrófilos.....	100
5.9.1.2	Coliformes Totales.....	101
5.9.1.3	Coliformes Fecales .....	101
5.9.1.4	Color.....	101
5.9.1.5	pH.....	102
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
6.1	Resultados del análisis multifactorial de la cuantificación de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante .....	103
6.2	Capacidad antimicrobiana de los extractos vegetales por el método de difusión en disco.....	108
6.3	Capacidad mínima inhibitoria MIC y capacidad mínima bactericida MBC... ..	109
6.4	Grosor y propiedades mecánicas de las biopelículas .....	111
6.5	Propiedades ópticas de las biopelículas .....	113
6.6	Propiedades de permeabilidad de las biopelículas .....	115
6.7	Permeabilidad al vapor de agua.....	115
6.8	Permeabilidad al oxígeno de las biopelículas.....	116
6.9	Morfología de las películas.....	117
6.10	Termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	118
6.11	Resultados vida de útil en carne .....	121
6.11.1	Análisis Microbiológicos.....	121
6.11.2	Mesófilos aerobios.....	121
6.11.3	Coliformes totales y coliformes fecales.....	123
6.11.4	Psicrófilos .....	124
6.11.5	Análisis físicos.....	124
6.11.5.1	Color (L, a*, b*) .....	124
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>128</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>129</b>

<b>9</b>	<b>Artículo No. 1. Antioxidant and antimicrobial capacity of three agroindustrial residues as animal feeds .....</b>	<b>141</b>
<b>10</b>	<b>Artículo No. 2 (En proceso de publicacion) Development and characterization of an edible biofilm of Gelatin-Chitosan with guava leaf extract used to increase the shelf life of beef.....</b>	<b>151</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura No. 1.</b> Estructura de la quitina y su producto desacetilado quitosano .....	30
<b>Figura No. 2.</b> Estructura de la gelatina .....	35
<b>Figura No. 3.</b> Chinche del sorgo (izquierda) y chinche del melón (derecha) .....	41
<b>Figura No. 4.</b> Copa de aluminio para realizar pruebas de permeabilidad al vapor de agua .....	50
<b>figura No. 5.</b> Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas. ....	55
<b>Figura No. 6.</b> Clasificación de los polifenoles y ejemplos de ellos .....	59
<b>Figura No. 7.</b> Método difusión en agar .....	72
<b>Figura No. 8.</b> Técnica de dilución en microplacas .....	73
<b>Figura No. 9.</b> Separación de saponinas y fenoles en embudo de separación de fases.....	82
<b>Figura No. 10.</b> Cuantificación de fenoles totales método Folin-Ciocalteu .....	83
<b>Figura No. 11.</b> Capacidad antimicrobiana difusión en disco .....	86
<b>Figura No. 12.</b> Prueba de capacidad antimicrobiana mínima inhibitoria .....	87
<b>Figura No. 13.</b> Moldes para elaborar biopelículas por método de casting. ....	89
<b>Figura No. 14.</b> Micrómetro para medir grosor de películas.....	90
<b>Figura No. 15.</b> Texturómetro .....	91
<b>Figura No. 16.</b> Copas de aluminio para medir permeabilidad al vapor de agua ...	93
<b>Figura No. 17.</b> Carne del músculo ( <i>Longissimus dorsi lumbar</i> ) .....	95
<b>Figura No. 18.</b> Charolas desechables metálicas de aluminio. ....	96
<b>Figura No. 19.</b> Película adherente comercial.....	96
<b>Figura No. 20.</b> Carne sin película (Testigo). ....	97
<b>Figura No. 21.</b> Carne con película comercial (T1).....	98
<b>Figura No. 22.</b> Carne con biopelícula (T2).....	98
<b>Figura No. 23.</b> Carne con biopelícula y extracto de hojas de guayaba (T3). ....	99
<b>Figura No. 24.</b> Método destructivo de carne.....	100
<b>Figura No. 25.</b> Toma de pH en carne.....	102
<b>Figura No. 26.</b> Biopelículas sin extracto (BSE).....	114
<b>Figura No. 27.</b> Biopelículas con extracto de hojas de guayaba (BCE).....	114
<b>Figura No. 28.</b> Micrografías de biopelículas sin extracto. ....	117
<b>Figura No. 29.</b> Micrografías biopelículas con extracto de guayaba. ....	118
<b>Figura No. 30.</b> Micrografía biopelícula sin extracto de guayaba .....	120
<b>Figura No. 31.</b> Micrografía biopelícula con extracto de guayaba.....	120

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro No. 1.</b> Plásticos derivados del petróleo utilizados en el envasado de alimentos.....	21
<b>Cuadro No. 2.</b> Box-Behnken.....	79
<b>Cuadro No. 3</b> Curva de pantrón de ácido gálico.....	84
<b>Cuadro No. 4.</b> Identificación de pozos en microplaca .....	88
<b>Cuadro No. 5.</b> Resultados del análisis multifactorial de fenoles totales, determinación saponinas y capacidad antioxidante de los tres residuos agroindustriales .....	105
<b>CuadroNo. 6.</b> Cuantificación de fenoles totales, saponinas, capacidad antioxidante abts del análisis multifactorial de tres residuos agroindustriales a diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos.....	106
<b>Cuadro No. 7</b> Resultados de la interacción concentración-especie de las variables fenoles totales, saponinas y capacidad antioxidante de tres residuos agroindustriales .....	107
<b>Cuadro No. 8.</b> Resultados del análisis antimicrobiano difusión en disco de extractos hidroalcohólicos de tres residuos agroindustriales .....	109
<b>Cuadro No. 9.</b> MIC y MBC de extractos de hojas de guayaba .....	111
<b>Cuadro No. 10.</b> Resultados de las pruebas mecánicas y grosor de las biopelículas.....	112
<b>Cuadro No. 11.</b> Muestra los valores físicos de las biopelículas.....	113
<b>Cuadro No. 12.</b> Valores de permeabilidad al oxígeno y al agua.....	116
<b>Cuadro No. 13.</b> Análisis microbiológicos en vida de anaquel de carne .....	126
<b>Cuadro No. 14.</b> Análisis de color en vida de anaquel de carne .....	127

# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 La carne**

La carne es la parte muscular comestible de los animales de abasto sacrificados y faenados en condiciones higiénicas. Se incluyen las porciones de grasa, hueso, cartílago, piel, tendones, nervios, vasos linfáticos y sanguíneos que normalmente acompañan al tejido muscular y que no se separan de él en los procesos de manipulación, preparación y transformación (Lee *et al.*, 2010; Códex Alimentarius, 2005).

## **1.2 La carne bovina**

### **1.2.1 Importancia económica de la carne bovina en México**

En México, uno de los alimentos más importantes es la carne de res, no solo por su aporte proteico, también por su aporte económico al país y esto se ve reflejado en la última década, donde se ha mostrado un incremento en el consumo de este producto anual promedio de 1.6 % y genera alrededor de 1.88 millones de toneladas anuales de carne en canal, Los principales productores son Veracruz (13.4 %), Jalisco (11.5 %), Chiapas (6.1 %), San Luis Potosí (5.5 %), Sinaloa (4.9 %), Baja California (4.8 %), Durango (4.5 %), Michoacán (4.1 %), Chihuahua (4.0 %) y Sonora (3.7 %) (SIAP, 2019; FIRA, 2017).

En cuanto a su consumo nacional este producto ha sufrido algunas disminuciones en esta década pasando de 18.0 a 14.8 kg por persona. Dicha disminución en el

consumo se dio debido al alto costo que presenta el producto en comparación con otras fuentes de proteína animal como el pollo y el cerdo, los cuales han ganado terreno y muestran consumos per cápita de 33.8 kg para carne de pollo y 19.0 kg para carne de cerdo. Sin embargo, estas afectaciones en el consumo han impulsado las exportaciones a otros países, donde se ha mostrado un incremento notable al pasar de 28 millones de toneladas en el 2007 a 183 mil toneladas comercializadas en 2017, siendo los principales destinos Estados Unidos (91.6 %), Japón (4.0%), Hong Kong (1.9 %) y Canadá (1.0 %). También se han iniciado las exportaciones en países como Qatar y Emiratos Árabes Unidos, Rusia, Indonesia, Irán, Singapur, Vietnam y Guatemala (SIAP, 2019; FIRA, 2017).

### **1.2.2 Características nutrimentales de la carne**

Dentro de la evolución humana, la carne roja siempre ha sido una parte fundamental de la alimentación, gracias principalmente a las propiedades nutrimentales que aporta al ser humano. Sin embargo, actualmente el exceso en el consumo de este tipo de productos está ligado a enfermedades como cáncer de colon, padecimientos cardiovasculares y obesidad, lo que ha generado una disminución en su consumo. No obstante, no existen documentos que prueben que un consumo moderado de carne roja magra pueda generar este tipo de problemas a la salud (Mcafee et al., 2010; Cosgrove, Flynn y Kiely, 2004).



Uno de los principales beneficios de la carne es su aporte proteico, ya que, es considerada una de las principales fuente de proteína animal. Aportar en promedio 20 g de proteína de alto valor biológico por cada 100 g de carne consumida. Además de que contiene todos los aminoácidos esenciales para el ser humano (lisina, metionina, triptófano, treonina, valina, fenilalanina, isoleucina y leucina), por otra parte es una importante fuente de minerales como hierro (vital en el desarrollo cognitivo temprano de los niños, el metabolismo energético normal y el sistema inmunológico), zinc (esencial para un sistema inmunológico saludable, curación de heridas y para el crecimiento normal y desarrollo reproductivo de los niños), selenio (actúa como un antioxidante y es necesario para la inmunidad) potasio (regulador de la presión arterial) además de ser rica en vitaminas como niacina, riboflavina, tiamina, B6, B12 y ácido fólico (que generan funciones importantes en el funcionamiento del sistema nervioso y en la liberación de energía de los alimentos) (Binnie *et al.*, 2014; Pereira y Vicente, 2013).

La carne bovina también es una fuente de lípidos que, como cualquier otra grasa, es la mayor fuente de energía, pero provee, además, nutrientes esenciales tales como vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales. Debido a la relación existente entre ingesta de grasa y enfermedades coronarias asociadas, se debe consumir con moderación prestando especial atención a su composición en ácidos grasos. La grasa es también el componente responsable del sabor de la carne bovina. Está compuesta de diversos tipos de ácidos grasos: saturados (AGS),

monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI). Puede estar presente en la carne, como grasa intermuscular y grasa intramuscular (marmoleado o veteado, dentro de los músculos) y grasa subcutánea (debajo de la piel). El contenido de grasa de la carne roja es variable, dependiendo del tipo de carne, el corte y del grado de recorte (IICA, 2015; McAfee et al., 2010).

### **1.2.3 Calidad de la carne**

La calidad de la carne cruda se puede definir como la idoneidad de la carne para su uso en un producto específico. Si la carne es adecuada para el producto para el que está destinada, entonces la calidad de la carne se define como buena. Si la carne es menos adecuada para el producto, entonces la calidad de la carne se define como mala. Por lo tanto, los atributos de la carne que determinan la calidad dependen del uso al que se destine la carne (Joo *et al.*, 2013; Aaslyng *et al.*, 2002).

La calidad sensorial de la carne tiene una importancia económica indirecta, ya que podría influir en la cantidad de producto vendido, especialmente con qué frecuencia un consumidor compra el mismo producto nuevamente (Joo *et al.*, 2013; Aaslyng *et al.*, 2002).

La calidad de la carne es un tema importante para la industria cárnica ya que actualmente ha aumentado la demanda de consumidores que buscan carne de alta calidad, buen sabor, inocua y saludable para garantizar el consumo cotidiano. Sin embargo, para producir carne bajo estas características es importante conocer los

rasgos de calidad y factores que la afectan, tanto intrínsecos (raza, edad del animal, factores *ante mortem* y *post mortem*) como extrínsecos, donde las condiciones de manipulación, proceso y almacenamiento serán alteradas por la presencia de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras), insectos, enzimas endógenas (presentes naturalmente en los tejidos cárnicos) enzimas exógenas (producidos por los microorganismos), reacciones químicas distintas a las enzimáticas (como la rancidez oxidativa) y acciones físicas (quemadura por frío, exudación, decoloración luminosa y aparición de colores anormales, entre otros (Joo *et al.*,2013; Aaslyng *et al.*, 2002).

#### **1.2.4 Características sensoriales de la carne**

Las preferencias del consumidor están relacionada directamente con los sentidos humanos como la vista, olfato, gusto y tacto y por medio de ellos, se pueden identificar la aceptabilidad del producto fresco o cocido. Dentro de los atributos en fresco más importante son el color, capacidad de retención de agua, textura y cantidad de grasa, mientras que los rasgos importantes para la carne cocida son la terneza, el sabor y la jugosidad (Joo *et al.*, 2013; Glitsh, 2000).

### **1.2.5 Características fisicoquímicos de la carne**

#### **1.2.6 Color en la carne**

El color es un atributo importante en la calidad de la carne cruda, ya que influye en el consumidor en la elección de la carne. Un color demasiado pálido o demasiado oscuro a menudo significa un rechazo por el. El color de la carne fresca es una combinación del reflejo debido a la desnaturalización de las proteínas como resultado del cambio de pH, la concentración y el estado oxidativo de la mioglobina. Una caída rápida del pH temprano *post mortem* da como resultado en un color pálido, mientras que un alto pH final da como resultado un color rojo oscuro. La mioglobina es de color púrpura, pero la oxidación a la oximioglobina da un color más rojo, que para muchos consumidores indica frescura. Durante el almacenamiento, la oximioglobina se puede oxidar aún más a la metamioglobina, lo que provoca una decoloración marrón. La tasa de oxidación depende de la especie (Mancini y Hunt, 2005; Aaslyng *et al.*, 2002).

#### **1.2.7 La vida útil de la carne**

La vida útil de alimentos, como la carne fresca, puede definirse como el tiempo máximo en el que los mismos mantienen sus cualidades nutritivas, sensoriales, fitoquímicas y microbiológicas alimentarias por encima de un nivel considerado como aceptable por los consumidores (González *et al.*, 2014).

La carne deshuesada refrigerada es altamente perecedera y su estabilidad depende de factores intrínsecos tales como pH, agua ligada, composición y la carga microbiana inicial; y extrínsecos, como el empaque y temperatura de almacenamiento (Esmer *et al.*, 2011).

### **1.2.8 Oxidación de la carne fresca**

La oxidación lipídica, es otra variable que puede afectar la vida útil de la carne, detectándose por cambios de sabor, color, textura, valor nutritivo y formación de posibles compuestos tóxicos. Esta alteración puede producirse como consecuencia no solo de los fenómenos de auto oxidación (enranciamiento oxidativo), sino también como resultado de la acción de las lipasas microbianas (enranciamiento enzimático hidrolítico) (González *et al.*, 2014; Onega, 2003).

### **1.2.9 La oxidación y los agentes oxidantes**

Químicamente la oxidación de un compuesto es la pérdida de electrones, de hidrógenos o la ganancia de oxígeno en una molécula. La reducción de un compuesto es exactamente lo contrario; es decir, la ganancia de electrones, de hidrógenos o la pérdida de oxígeno. En tal sentido, un agente oxidante es una molécula que se reduce al reaccionar con la molécula a la cual oxida. Este par oxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender la biología de las óxido-reducciones en el organismo. Las macromoléculas de importancia biológica

(proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos) son moléculas nucleofílicas que tienen electrones susceptibles de compartir, es decir, tienen electrones en orbitales superficiales que pueden ser capturados (oxidación) o compartidos en una reacción nucleofílica para formar compuestos o aductos (Quintanar y Calderón, 2009; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los oxidantes son compuestos electrofílicos, que tienen afección por los electrones y que tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de la mayor importancia biológica. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), son un subgrupo de moléculas oxidantes, que como su nombre lo indica son altamente reactivas. Otro subgrupo son los radicales libres que no solo tienen alta reactividad y capacidad oxidativa, sino que adicionalmente pueden generar reacciones oxidativas en cadena. Los radicales libres en particular y las especies reactivas en general, participan en algunas funciones biológicas (proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis, metabolismo, reacciones inflamatorias) y se encuentran involucradas en diversas patologías (Konigsberg, 2008; Avello y Suwalsky, 2006).

#### **1.2.10 Radicales libres en la carne**

En forma general, un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente; sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse,

es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena (Quintanar y Calderón, 2009; Avello y Suwalsky, 2006).

### **1.2.11 Microorganismos en carne fresca**

La diversa composición nutricional de la carne la convierte en un entorno ideal para el crecimiento y propagación de microorganismos de descomposición y patógenos, comúnmente transmitidos por los alimentos (Zhou *et al.*, 2010). Mismos que son la principal causa del deterioro de la carne almacenada a temperaturas de refrigeración. El tipo y número de microorganismos son factores importantes que inciden en la velocidad de alteración, como consecuencia de ello, se presentan cambios sensoriales indeseables en olor y apariencia, determinantes en la aceptación y vida útil (Pal *et al.*, 2018).

Se considera que la mayoría de los tejidos comestibles provenientes de un animal sano son estériles (o poseen un nivel muy bajo de contaminación bacteriana) al momento de ser sacrificado. Sin embargo, la muerte del animal se acompaña de una paralización de los sistemas de defensa frente a la invasión y crecimiento de

organismos extraños. La carne fresca comienza a sufrir modificaciones desde que el animal se sacrifica, tan pronto como el animal es desangrado los mecanismos de defensa contra microorganismos invasores prácticamente desaparecen. Por otro lado, los microorganismos que pueden estar presentes en el animal, se localizan generalmente en los nodos linfáticos, vísceras y en algunas cavidades y si alguna de estas partes entra en contacto con la canal, puede a su vez aumentar la contaminación exógena. En este sentido, es durante las operaciones de preparación de la canal (desollado, despiece y manteado, entre otros.), distribución y venta, en donde se produce la contaminación microbiana (Nychas *et al.*, 2007).

Dentro de los microorganismos dañinos que se pueden encontrar en la carne por su composición y pH están *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* y *Aeromonas*. Así como, bacterias patógenas que incluyen: *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *C. perfringens* y *E. coli* O157: H7, levaduras y mohos: *Candida*, *Torulopsis*, *Rhizopus*, *Sporotrichum*, *Fusarium*, *Monilia* y *Aspergillus* (Karabagias *et al.* 2011, Nychas *et al.*, 2007).

### **1.3 Principales microorganismos que causan enfermedades de transmisión por alimentos**

El trastorno gastrointestinal debido a la ingestión de alimentos se puede dar por diferentes causas: ingestión excesiva de alimentos, alergias, carencias nutritivas, envenenamientos químicos causados por toxinas de plantas o animales e intoxicaciones bacterianas. Hay dos microorganismos principales que causan estas



enfermedades (*Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*). Lo hacen mediante invasión a un hospedero o por las toxinas generadas en dicho hospedero (Martino-Zagovalov *et al.*, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en los países menos desarrollados, las ETA's son la principal causa de enfermedad y muerte. Se asocian a una carga socioeconómica significativa, y alrededor de 70% se originan por la ingestión de alimentos contaminados con los siguientes microorganismos: norovirus, *Campylobacter spp.*, *Salmonella entérica*, *Salmonella typhi*, *Taenia solium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella sp.* Las cuales pueden presentarse en cualquier lugar, aunque predominan en áreas donde se practican malos hábitos higiénico-sanitarios (Carrasco y Lozano, 2017). Dichos microorganismos se describen a continuación.

### **1.3.1 *Escherichia coli* O157; H7**

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae que fermenta glucosa y lactosa. Existen cepas móviles e inmóviles, presentan fimbrias o pili, que son de gran importancia para la adherencia a las superficies mucosas del hospedero. Es un microorganismo que se encuentra presente en la microflora de humanos y animales de sangre caliente (Herendia *et al.*, 2014; Rodríguez-Ángeles, 2002).

Existen seis grupos patogénicos que basados en sus factores de virulencia y características fenotípicas, se han clasificado en: *E. coli* enteropatogénica, enteroagregativa, enterotoxigénica, de adherencia difusa, enteroinvasiva y productoras de toxinas shiga. Estas últimas incluyen el subgrupo enterohemorrágico, este grupo han sido detectado en diferentes productos, como cárnicos, lácteos, pescados, mariscos, bebidas y leguminosas (Varela *et al.*, 2016, Herendia *et al.*, 2014).

Dentro de los más peligrosos en alimentos podemos encontrar *E. coli* O157:H7. Esta bacteria es capaz de producir dos tipos de toxina shiga, Stx1 y Stx2, que ocasionan diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Este patógeno es transmitido a través de leche no pasteurizada, bebidas contaminadas, verduras frescas y consumo carne cruda o mal cocida, y a través del contacto persona a persona a causado en Estados Unidos 73000 casos y 61 muertes al año (Varela *et al.*, 2016; Herendia *et al.*, 2014).

### **1.3.2 *Salmonella***

Es un bacilo Gram negativo, no esporulado, anaerobio facultativo con flagelos móviles; pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae tribu salmonellae. En la actualidad se reconocen dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, los cuales se clasifican de acuerdo a sus antígenos O (lipopolisacárido), Vi (polisacárido capsular) y H (flagelar) (Varela *et al.*, 2016; Herendia *et al.*, 2014).

Pueden serotipificarse más de 2,300 serovariedades que poseen diferentes factores de virulencia, tales como adhesión, invasión y los genes relacionados a la producción de toxina, y todos ellos se agrupan en ciertas áreas del cromosoma conocidas como islas de patogenicidad. Para la adhesión bacteriana *Salmonella* emplea fimbrias de diferentes tipos durante el proceso de infección. Las cuales, se encuentran codificadas en operones, además de poseer un plásmido de virulencia que contiene genes que ayudan a la multiplicación bacteriana en las células del sistema reticuloendotelial (Barreto *et al.*, 2016; Herendia *et al.*, 2014).

Aquellos serotipos causantes de enfermedad en animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie entérica: *S. entérica* serovar enteritidis (*S. enteritidis*) y *S. entérica* serovar typhimurium (*S. typhimurium*), ambas poseen un amplio rango de hospederos y la mayoría de las veces generan una enfermedad gastrointestinal. En el ser humano en el cual se trasmite por la ruta fecal-oral, ya sea directamente, o bien indirectamente, a través de los alimentos. Es capaz de sobrevivir la acidez del estómago y la alta osmolaridad del intestino delgado, induce su internalización por las células epiteliales intestinales del íleon y resiste la fagocitosis mediada por las células dendríticas y macrófagos, logrando colonizar el tejido linfoide subyacente y los ganglios linfáticos mesentéricos (Barreto *et al.*, 2016).

### **1.3.3 *Listeria monocytogenes***

Es un bacilo Gram positivo patógeno facultativo intracelular y formador de esporas. Puede sobrevivir o crecer a valores de pH tan bajos como 4.4 y a concentraciones de sal hasta del 14 %. Esta bacteria es psicrótrfica y crece a temperaturas entre 1 y 45 °C. Los alimentos refrigerados son un ambiente ideal para este patógeno. Se puede encontrar en alimentos como leche, quesos, verduras frescas, mariscos, productos cárnicos y alimentos listos para el consumo. Otro factor importante, es la formación de biopelículas ya que protegen a esta bacteria contra la desinfección y favorece su supervivencia en las superficies que están en contacto con los alimentos, lo cual aumenta la contaminación cruzada de estos y los convierte en un vehículo para llegar al hombre y causar la enfermedad (Varela *et al.*, 2016; Herendia *et al.*, 2014).

Este microorganismo se ha clasificado en 17 serovariedades en donde *Listeria monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis, invasiva o no invasiva. La forma invasiva puede provocar mortinatos, abortos, partos prematuros, y en los recién nacidos e inmunodeprimidos puede conducir a septicemia, meningitis y encefalitis. En la forma no invasiva, se producen síntomas como fiebre, dolor de cabeza y diarrea (Varela *et al.*, 2016).

En los últimos 25 años. *Listeria monocytogenes* se ha vuelto importante como un patógeno asociado a los alimentos. La mayoría de los países de la Unión Europea

tienen una incidencia anual de listeriosis humana de entre dos y diez casos reportados por millón. Debido a su alta tasa de letalidad, la listeriosis se encuentra entre las causas más frecuentes de muerte por enfermedades transmitidas por alimentos. Las infecciones por esta bacteria son responsables de las tasas más altas de hospitalización (91%) entre los patógenos conocidos transmitidos por los alimentos y se han relacionado con episodios esporádicos y grandes brotes de enfermedades humanas en todo el mundo. La capacidad de persistir en entornos de procesamiento de alimentos y multiplicarse bajo temperaturas de refrigeración hace que sea una amenaza significativa para la salud pública. La contaminación por este microorganismos es una de las principales causas microbiológicas de los retiros de alimentos, principalmente de carne, aves, mariscos y productos lácteos (Jemmi y Stephan, 2006).

#### **1.4 Conservación de alimentos**

La distribución y comercialización de alimentos exige una serie de requisitos que garanticen su seguridad y el mantenimiento de su calidad. Sin embargo, esto, que parece obvio, no es tan fácil de conseguir, ya que existen una serie de agentes y de procesos a través de los cuales los alimentos pierden calidad o atentan a la seguridad alimentaria. Entre ellos se encuentran la temperatura y la luz, el oxígeno, la humedad y el crecimiento de microorganismos, que provocan cambios en las vitaminas, oxidación de las grasas, aparición de la rancidez, cambios importantes en las características sensoriales y proliferación microbiana, que contamina los

alimentos y los invalida para su consumo (Nerín de la Puerta, 2009; FAO, 2002).

Los procesos de conservación que la industria demanda deben permitir obtener productos de excelente calidad, a un precio razonable y que por encima de todo sean seguros. Así, se busca que los nuevos métodos de tratamiento y conservación, sean menos agresivos con el alimento, con un menor consumo energético y más eficaz contra enzimas y microorganismos patógenos alterantes (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014; FAO, 2002).

#### **1.4.1 Conservación de alimentos cárnicos**

El término carne fresca, incluye carne de animales recientemente procesados, así como carne envasada al vacío o carne envasada en atmósfera controlada (empaques plásticos) o la aplicación de gases que no hayan sido sometidos a ningún otro tratamiento que no sea el enfriamiento. Este tipo de procesos son utilizados principalmente en la conservación de carne. Principalmente ocupados por inhibir el deterioro microbiano. La temperatura de conservación, el oxígeno atmosférico (O<sub>2</sub>), las enzimas endógenas y la humedad (deshidratación), todos estos factores, ya sea solos o en combinación, puede dar lugar a cambios perjudiciales en el color, textura y sabor de carne. De lo anterior, la importancia de aplicar algún método de conservación a la carne. Los más importantes pueden se pueden agrupar en tres categorías, basadas en el control por temperatura, por humedad y más directamente por procesos inhibitorios (bactericidas y

bacteriostáticos, tales como radiación ionizante y embalaje, entre otros (López Hernández *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2010).

Las nuevas tecnologías de conservación para la carne fresca más investigadas son las tecnologías de inactivación no térmica, como la alta presión hidrostática, nuevos sistemas de envasado como el envasado en atmósfera modificada y el envasado activo, los compuestos antimicrobianos naturales y la biopreservación. Todas estas tecnologías alternativas intentan ser moderadas, ahorran energía, respetan el medio ambiente y garantizan un aspecto natural al tiempo que eliminan los patógenos y microorganismos que la descomponen (López Hernández *et al.*, 2013; Devlieghere *et al.*, 2004).

#### **1.4.2 Envasado**

Los envases juegan un papel fundamental en la industria alimentaria ya que realizan importantes funciones como la de “contener, proteger, manipular, distribuir y presentar mercancías”, desde materias primas hasta artículos acabados, y desde el fabricante hasta el usuario o el consumidor. Entre estas funciones destaca la acción protectora, ya que contribuyen al retraso del deterioro, aumentan la vida útil y mantienen la calidad y seguridad de los alimentos envasados (Quintero *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2010).

Actualmente, los envases son esenciales para la comercialización de los alimentos, ya que además de ofrecer una mejor conservación, mayor tiempo de vida de anaquel y seguridad e información para el consumidor, deben generar un impacto visual que los diferencie de productos similares para lograr la preferencia de los consumidores a quienes va dirigido el producto (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2010).

En los últimos años, los sistemas de envasado para alimentos han ido evolucionando como respuesta a las exigencias de los consumidores en cuanto a caducidad, conservación de sus propiedades, frescura y apariencia. Por una parte, los métodos modernos de mercadotecnia necesitan un envasado atractivo que comunique algo al consumidor, para que de esta forma, éste adquiriera el producto, además de adaptarse a los cambios de su forma de vida (Martínez-Tenorio y López-Malo, 2011).

El propósito de los envases prácticamente es disminuir los efectos de deterioro, que pueden incluir decoloración, mal sabor y desarrollo de mal olor, pérdida de nutrientes, cambios de textura, patogenicidad y otros factores medibles. Los cuales son generados principalmente por agentes externos procedentes del ambiente como el calor, luz, humedad, oxígeno, presión, enzimas, olores indeseables, microorganismos, insectos, suciedad y partículas de polvo o emisiones de gases, que suponen una disminución a la calidad o inocuidad. Por otra parte, desde un punto de vista comercial, los envases se emplean para identificar un producto



determinado, y también para proporcionar información importante como, por ejemplo, el peso, ingredientes o valor nutricional, fecha de elaboración o caducidad (Perez, 2012; Restuccia *et al.*, 2010).

### **1.4.3 Envasado de carne fresca**

Las variables que influyen en las propiedades de vida útil de la carne fresca envasada son el tipo de producto, la atmósfera, el envase, el material de embalaje, la temperatura de almacenamiento y los aditivos. El envasado de carne fresca debe ser mínimamente permeable a la humedad, de tal manera que se evite la desecación de la superficie, mientras que la permeabilidad al gas varía con el tipo de película en particular utilizado. Las opciones de envasado para la carne cruda refrigerada son: envasado permeable al aire, vacío de O<sub>2</sub>, envasado de atmosfera modificada O<sub>2</sub> bajo con gases anóxicos, entre otros (Zhou *et al.*, 2010; Devlieghere *et al.*, 2004).

### **1.4.4 Componentes naturales aplicados a envases cárnicos**

Existen numerosos agentes antimicrobianos en animales, plantas y microorganismos que a menudo se desarrollan como mecanismos de defensa del huésped. Ejemplos típicos de compuestos investigados son lactoperoxidasa (leche), lisozima (clara de huevo, higos), saponinas y flavonoides (hierbas y especias), bacteriocinas (bacterias ácido lácticas) y quitosano (exoesqueleto de camarón). Los

cuales, han mostrado carácter antimicrobiano medido en *in vitro*. Sin embargo, a menudo obvian aspectos cruciales para la aplicación práctica de los compuestos naturales: (1) los cambios en las propiedades sensoriales y texturales del alimento cuando es agregado y (2) la interacción de estos compuestos con los ingredientes de los alimentos y la influencia de esta interacción sobre su eficacia. En muchos casos, las concentraciones de los compuestos antimicrobianos en hierbas y especias son, por ejemplo, demasiado bajas para ser utilizadas de manera efectiva y sin efectos adversos en las características sensoriales de un producto alimenticio. Además, el carácter lipófilo de muchos de estos fito-antimicrobianos dificulta la práctica (Zhou *et al.*, 2010; Devlieghere *et al.*, 2004).

### **1.5 Envases plásticos**

Dentro de los envases más ocupados en alimentos se pueden encontrar a los de base petroquímica (Cuadro No. 1), que cada vez se usan con mayor frecuencia debido a sus excelentes propiedades de transparencia, estructurales, propiedades de barrera a los gases al agua, así como sus cualidades mecánicas y bajo costo (Nur Hanani *et al.*, 2014). En el área de cárnicos los empaques más ocupados son las películas que funcionan como barreras selectivas para la transferencia de gases, humedad y nutrientes, evitan la oxidación y pérdida de compuestos volátiles, así como la presencia de microorganismos, con lo que ayudan a disminuir el deterioro de los productos causado por factores ambientales (Domínguez y Jiménez, 2012).

**CUADRO No. 1.** Plásticos derivados del petróleo utilizados en el envasado de alimentos.

Tipo	Material	Abreviatura	Aplicaciones
1	Polietileno tereftalato	PET	Botellas
2	Polietileno de alta densidad	PEAD	Botellas y bandejas
3	Policloruro de vinilo	PVC	Películas flexibles
4	Polietileno de baja densidad	PEBD	Películas, bolsas
5	Polipropileno	PP	Películas flexibles
6	Poliestireno	PS	Bandejas
7	Policarbonatos y resinas		

Cuadro adaptado de López, 2013.

### 1.5.1 Problemáticas de los envases plásticos

Uno de los atributos negativos de los plásticos, es que no se consideran amigables con el medio ambiente. Esto por su composición, ya que son derivados de subproductos del procesamiento de petróleo crudo considerado un producto no renovable y no biodegradable (Nur Hanani *et al.*, 2014). Por lo cual, su uso excesivo por los consumidores ha generado una alta contaminación del planeta donde la flora y fauna de ecosistemas de ríos y mares son los más afectados. Por otro lado, su incineración produce sustancias altamente tóxicas que generan graves problemas de contaminación a la salud humana (García-Díaz y Macías-Matos, 2008).

Sin embargo, el mayor peligro de los plásticos es el que generan al entrar en contacto con los alimentos, el plástico es un compuesto sintético ya que no existe ningún material que sirva como envase que sea considerado completamente inerte. Todos interaccionan en mayor o menor medida con el producto envasado y como consecuencia de estas interacciones, los alimentos que contienen se verán afectados. Existen tres tipos de interacciones envase-producto los cuales se describen continuación (Nerín de la Puerta, 2009; García-Díaz y Macías-Matos, 2008).

- Sorción: proceso mediante el que compuestos existentes a ambos lados de la pared del envase se fijan en el material de envase. Posteriormente, dichos compuestos podrían transferirse al alimento en contacto con él, provocando su contaminación.
- Permeación: es la transferencia de gases, radiación, aromas, entre otros, a través de la pared del envase y en ambos sentidos.
- Migración: proceso de transferencia de masa desde el envase al producto envasado. Este proceso de migración tiene dos vertientes, una con connotaciones claramente negativas, ya que desde el envase se pueden transferir a los alimentos muchas sustancias químicas no deseadas e incluso tóxicas, como monómeros, plastificantes, antioxidantes sintéticos y aditivos de cualquier naturaleza, produciendo la contaminación del alimento.

La migración de sustancias tóxicas es considerada la mayor forma de transferencia de éstas y puede aumentar con incrementos de temperatura por arriba de los 20 °C y con el tiempo de almacenamiento del producto. El policloruro de vinilo y el poliestireno son a los que se les considera los más tóxicos (Nerín de la Puerta, 2009; García-Díaz y Macías-Matos, 2008).

## **1.6 Bioplásticos**

En las últimas décadas, ha habido un marcado aumento en el uso de materiales y recubrimientos de película a base de polímeros naturales en envases y embalajes para la industria alimentaria, que tengan las mismas propiedades (mecánicas, de barrera y de transmisión de la luz) y realicen la misma funciones (contener, proteger, manipular, distribuir y presentar) de los plásticos convencionales. Los recubrimientos y películas comestibles no pretenden reemplazar los materiales de empaque tradicionales, sino proporcionar una alternativa adicional para la conservación de alimentos, así también puede ayudar a reducir el costo y la cantidad de empaque tradicional utilizado. Muchos de estos productos provienen de desechos agroindustriales o de recursos naturales, además de que por su conformación muchas pueden ser comestibles (Ramos *et al.*, 2016; Nur Hanani *et al.*, 2014; López, 2013).

### **1.6.1 Biopelícula**

Una película comestible (PC) es una matriz preformada y delgada, que posteriormente será utilizada en forma de recubrimiento del alimento o estará ubicada entre los componentes del mismo (Fernández *et al.*, 2013; Quintero *et al.*, 2010).

### **1.6.2 Recubrimiento plástico**

Un recubrimiento comestible (RC) se puede definir como una matriz continua, delgada, que se estructura alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en la solución formadora del recubrimiento (Fernández *et al.*, 2013; Quintero *et al.*, 2010).

### **1.6.3 Biopelículas y recubrimientos en alimentos**

El uso de una PC o RC en aplicaciones alimentarias y en especial en productos altamente perecederos, se basa en ciertas características tales como bajo costo, disponibilidad, atributos funcionales, propiedades mecánicas (tensión y flexibilidad) y propiedades ópticas (brillo y opacidad). Su efecto barrero frente al flujo de gases, resistencia estructural al agua, a microorganismos y su aceptabilidad sensorial. Estas características son influenciadas por parámetros como el tipo de material implementado como matriz estructural (conformación, masa molecular, distribución de cargas), las condiciones bajo las cuales se preforman las películas (tipo de

solvente, pH, concentración de componentes, temperatura, entre otras), y el tipo y la concentración de los aditivos (plastificantes, agentes entrecruzantes, antimicrobianos, antioxidantes y emulsificantes, entre otros.) (Quintero *et al.*, 2010).

#### **1.6.4 Componentes para la formación de biopelículas o recubrimientos**

Hay diferentes técnicas para la formulación de películas, dentro de las más importantes podemos ocupar el secado en placa (*casting*), presión y extrusión. La formulación de películas y recubrimientos para aplicaciones de envasado de alimentos debe incluir al menos un componente capaz de formar una matriz tridimensional cohesiva un solvente y un plastificante. Las bases poliméricas más utilizadas en películas comestibles en envases de alimentos son proteínas, polisacáridos y lípidos (Musso, 2017; Ramos *et al.*, 2016).

#### **1.6.5 Secado en placa (*casting*)**

Para la preparación de la película, las materias primas deben primero disolverse o dispersarse utilizando un solvente como agua, alcohol, ácidos, mezcla de agua y alcohol o una mezcla de otros solventes (Cazón *et al.*, 2017). Posteriormente, se requiere ajustar el pH y / o calentar las soluciones para facilitar la solubilidad de algunos biopolímeros. Después, se reducen las temperaturas y se adicionan sustancias con propiedades plastificantes para proporcionar a las películas un buen comportamiento mecánico en términos de flexibilidad. El más utilizado es el glicerol,

debido a su mejor estabilidad y compatibilidad con las cadenas biopoliméricas hidrófilas en comparación con el sorbitol, polietilenglicol y algunos azúcares (Tharanathan, 2003). También en este proceso se pueden adicionar agentes antimicrobianos, colorantes o saborizantes. Luego, la solución formadora de película se moldea y se seca a las temperaturas deseadas y las condiciones de humedad relativa para obtener películas independientes (Kaur y Dhillon, 2014).

Como recubrimiento, las soluciones formadoras de película se pueden aplicar a los alimentos como revestimiento mediante varios métodos que incluyen inmersión, rociado, cepillado y cribado, seguido de secado (Cazón *et al.*, 2017).

En ambos casos para poder ser considerado como biopolímero debe de ser capaz de ser degradado en última instancia por microorganismos (bacterias, hongos y algas) a través de procesos de compostaje para producir compuestos de descomposición natural tales como dióxido de carbono, agua, metano y biomasa en un lapso no mayor a 3 meses (Nur *et al.*, 2014).

#### **1.6.6 Principales bases poliméricas de bioplásticos**

#### **1.6.7 Hidrocoloides**

Los hidrocoloides son un grupo grande, heterogéneo, de sustancias poliméricas que incluyen principalmente polisacáridos y algunas proteínas que tienen buenas propiedades para la elaboración de películas. Los hidrocoloides tienen una buena



capacidad para formar una matriz continua y cohesiva con propiedades mecánicas adecuadas. Dicha capacidad está relacionada con la estructura química (naturaleza, peso molecular y cargas entre otros.) de estos compuestos, que permite la asociación a través de enlaces de hidrógeno de sus cadenas poliméricas (López, 2013; Campos *et al.*, 2011).

De manera general, la formación de una red macromolecular de un biopolímero tipo hidrocoloide requiere de algunas etapas: en primer lugar, una solubilización (parcial o total) que permita una ruptura de enlaces intermoleculares de baja energía que estabilicen a los polímeros en su estado nativo. De esta manera se facilita un reordenamiento y orientación de las cadenas poliméricas y una interacción con el resto de componentes que forman la película (López, 2013; Campos *et al.*, 2011).

### **1.6.8 Principales bases poliméricas de bioplásticos**

#### **1.6.8.1 Polisacáridos**

Los polisacáridos son polímeros cuyos constituyentes (sus monómeros) son monosacáridos, los cuales se unen repetitivamente mediante enlaces glucosídicos., estos compuestos llegan a tener un peso molecular muy elevado, que depende del número de residuos o unidades de monosacáridos que participen en su estructura. Así mismo se pueden encontrar polisacáridos con carga neutra (agar y metilcelulosa), carga negativa (alginato de sodio, carragenano, pectina) o carga positiva (quitosano) en función de los grupos químicos unidos a los monosacáridos

(Domínguez y Jiménez, 2012; Tharanathan, 2003).

### **1.6.8.2 Quitosano**

El segundo polisacárido más abundante encontrado en la naturaleza después de la celulosa es la quitina, y el quitosano se obtiene por N-desacetilación alcalina de ésta (Figura No. 1). La quitina se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos e insectos, además de pared celular de algunos hongos y algas. Por esta razón, el quitosano está disponible comercialmente a partir de abundantes fuentes renovables. Sin embargo, principalmente residuos de la industria de mariscos como camarón y jaiba (Cazón *et al.*, 2017). El quitosano es un polisacárido lineal que consta de unidades repetidas de  $\beta$  (1-4)-2-amino-2-deoxiD-glucosa cuando está completamente desacetado, como se puede ver en la Figura 1. (Pereda *et al.*, 2014; Lárez, 2006).

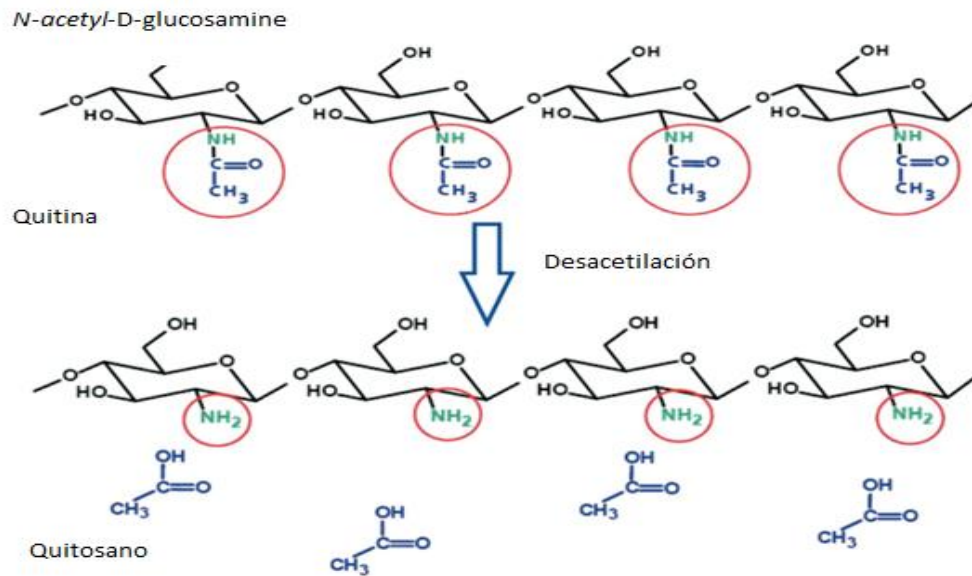
Este polisacárido es considerado naturalmente no tóxico, biofuncional, biocompatible y biodegradable, ha sido ampliamente utilizado en la preparación de películas y recubrimientos antimicrobianos debido a su propiedad de inhibir o retrasar el crecimiento de hongos y de numerosas bacterias patógenas y levaduras (Cazón *et al.*, 2017; Pereda *et al.*, 2014).

Aunque el mecanismo de la actividad antimicrobiana del quitosano todavía no se discierne, existen algunas hipótesis. La hipótesis más aceptada atribuye la actividad

antimicrobiana a un cambio en la permeabilidad celular debido a las interacciones entre las moléculas de quitosano cargadas positivamente y la membrana de células microbianas con carga negativa. La otra hipótesis es la interacción de los productos de hidrólisis difusa con el ADN microbiano que inhibe la síntesis de mRNA y proteínas y los metales quelantes, elementos de esporas y nutrientes esenciales (Cazón *et al.*, 2017; Pereda *et al.*, 2014).

Otra propiedad relevante del quitosano es su baja toxicidad con una dosis letal media de 16 mL/kg. Es un producto altamente biodegradable a tal punto que puede ser degradado por enzimas del organismo humano, lo cual lo hace formar películas comestibles además de que forma polímeros bioadherentes y transparente (Valenzuela y Arias, 2012; Hernández, 2004).

El quitosano es insoluble en agua y en solventes orgánicos comunes. Sin embargo, la solubilidad depende del grado de N-acetilación (DA) y del peso molecular. Aunque el tipo de solvente más adecuado del quitosano es en soluciones ácidas por debajo de pH 6.3 y se considera tomando siempre en cuenta la concentración, ya que a concentraciones superiores a > 2% peso/peso, la solución resultante se vuelve muy viscosa y dificulta su solución en el solvente. En cuanto al método para formación de películas más ocupado en investigaciones es el de vaciado en placa (*casting*) (Kaur y Dhillon, 2014).



**Figura No. 1.** Estructura de la quitina y su producto desacetilado quitosano (Kaur y Dhillon, 2014)

### 1.6.8.3 Proteínas

En sus estados nativos, las proteínas generalmente existen como proteínas fibrosas, que son insolubles en agua y sirven como los principales materiales estructurales de los tejidos animales, o como proteínas globulares, que son solubles en agua o soluciones acuosas de ácidos, bases o sales y funcionan ampliamente en general (Nur Hanani *et al.*, 2014; Bourtoom, 2008). Las proteínas son polímeros que contienen más de 100 residuos de aminoácidos y están hechos de 20 aminoácidos proteinogénicos que se unen entre sí mediante enlaces covalentes péptidos. Las proteínas son muy diferentes en forma y función dependiendo de su origen, estructuras y composición y acomodo de aminoácidos a lo largo de la

cadena. Cada aminoácido se compone de carbono central (carbono  $\alpha$ ) unido a hidrógeno, un grupo carboxilo (COOH), un amino (NH<sub>2</sub>) y una única cadena lateral de aminoácidos o grupo R, que identifica y distingue un aminoácido de otro. Las proteínas se clasifican en cuatro estructuras básicas o niveles de estructuración, llamadas; primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias (Nur Hanani *et al.*, 2014; Bourtoom, 2008).

- Estructura primaria: es aquella en la que la secuencia de aminoácidos está y es formando cadenas lineales.
- Estructura secundaria: es aquella en la que la forma de las moléculas de la proteína existen en forma hélice  $\alpha$  o lamina  $\beta$  y que se produce mediante la unión de hidrógeno entre los grupos ( $-C = O$ ) y ( $-N-H$ ) dentro de la cadena y los bloques de construcción de aminoácidos primarios. Es decir es un plegamiento periódico de la estructura primaria.
- Estructura terciaria: es aquella que incluye cuando el plegamiento y flexión de las moléculas de proteínas se produce debido a las interacciones con los grupos R en aminoácidos individuales. Esta interacción puede ocurrir como resultado de enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, enlace covalente o enlace iónico, dependiendo de la polaridad de los grupos R.
- Estructura cuaternaria: resultados de la estructura como consecuencia de interacciones no covalentes que se unen a múltiples polipéptidos en un gran

complejo macromolecular. Es el acomodo de las estructuras terciarias en el espacio.

En cuanto a la ocupación en bases poliméricas, las proteínas tienen que estar desnaturalizadas (Sin su formación estructural) con la finalidad de formar estructuras más extendidas para poder ser ocupadas en películas, efecto que se logra aplicando temperatura (calor) o por modificación de pH (ácido o alcalino). Una vez extendidas, las cadenas de proteínas pueden asociarse mediante enlaces iónicos, covalentes o puentes de hidrógeno, para producir películas cohesivas. La interacción de cadena a cadena que produce películas cohesivas se ve afectada por el grado de extensión de la cadena, la naturaleza y secuencia de los residuos de aminoácidos (Nur Hanani *et al.*, 2014; Bourtoom, 2008).

La distribución uniforme de los grupos polares, hidrófobos a lo largo de la cadena del polímero aumenta la probabilidad de las interacciones respectivas. El aumento en estas interacciones de la cadena del polímero da como resultado películas más fuertes, pero menos flexibles y menos permeables a los gases, vapores y líquidos. Los polímeros que contienen grupos que pueden asociarse a través de puentes de hidrógeno o enlaces iónicos dan como resultado películas que son excelentes barreras de oxígeno pero que son susceptibles a la humedad. Por lo tanto, se espera que las películas de proteínas sean buenas barreras al oxígeno a bajas humedades relativas (Bourtoom, 2008).

En comparación con las películas sintéticas, las películas basadas en proteínas exhiben una pobre resistencia al agua y menor resistencia mecánica. Sin embargo, las proteínas son generalmente superiores a los polisacáridos, en su capacidad para formar películas con mayores propiedades mecánicas y de barrera a los gases oxígeno y dióxido de carbono (Acosta, 2014). Dentro de las principales fuentes de obtención de proteínas para películas se encuentran la proteína de soya, zeína de maíz, caseinato de sodio, gluten de trigo, proteína de guisantes, proteína de girasol, queratina, proteína miofibrilar, gelatina de pescado y gelatina o colágeno animal (Cazón *et al.*, 2017). Sin embargo, ésta última posee un alto potencial comercial, la gelatina comparada con otros materiales posee altas temperaturas de fusión, es termorreversible, también actúa como agente espesante, gelificante y emulsionante (Gómez-Guillén *et al.*, 2009).

#### **1.6.8.4 Gelatina**

La gelatina es una mezcla heterogénea de proteínas de alto peso molecular, solubles en agua, de diferentes puntos isoeléctricos y diferentes propiedades de gelificación. Su estructura se muestra en la Figura No. 2. Se obtiene por la hidrólisis selectiva (ácida o básica) parcial del colágeno de estructura primaria, secundaria o terciaria, sometido a un proceso térmico derivado de la piel, tejido conectivo y huesos proveniente de especies terrestres, marinas o insectos. En la actualidad, se estudia la posibilidad de obtenerla de microorganismos genéticamente modificados

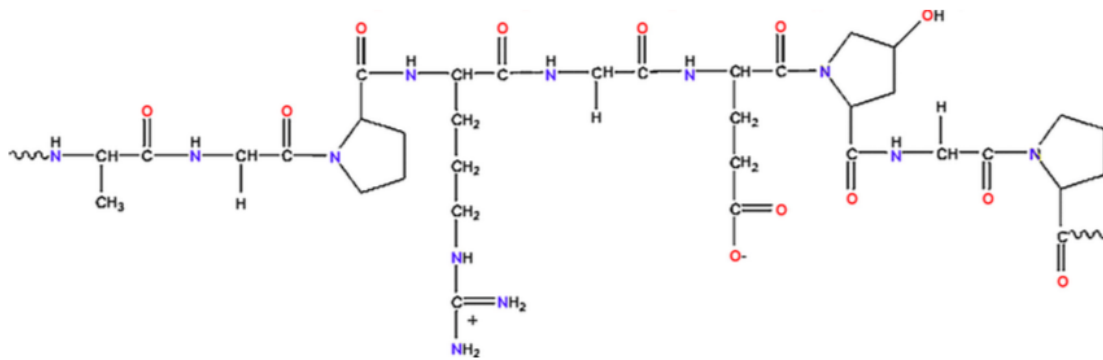
para eliminar las variables asociadas al uso de tejidos como material (Mad-Ali *et al.*, 2017; Serna-Cock *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2005 ).

En la mayor parte del mundo la gelatina es ocupada como una proteína gelificante que se ha aplicado ampliamente en las industrias alimentaria y farmacéutica. La mayor parte de la gelatina comercial (95%) se obtiene de residuos conectivos y pieles de cerdos y vacas aunque en algunos países por razones inicialmente socio-culturales (productos Kosher y del Islam) o sanitarias (encefalopatía espongiiforme) los productos derivados de mamíferos tienen una utilidad limitada para el procesamiento en productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos funcionales. De ahí la importancia de investigar otras fuentes de gelatina como son los productos de mar o insectos que cumplen funciones similares (Mariod y Fadul, 2015; Gómez-Guillén, 2011).

La habilidad de formar geles reversibles al calor es una de las más importantes propiedades de la gelatina en las industrias. En cuanto a su producción, calidad y rendimiento estarán determinados por propiedades fisicoquímicas como viscosidad y claridad, que dependerá de la materia prima y su pretratamiento, del método de extracción del colágeno original, el pH, la temperatura empleada en la extracción y el número de electrolitos en el material resultante (Serna-Cock *et al.*, 2007). Por otra parte, otro factor importante en su calidad y uso es su composición de aminoácidos, la gelatina es rica en aminoácidos tales como la prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina. Estos interactúan durante la preparación de las películas y como



consecuencia de ello, forman enlaces cruzados inter o intramoleculares que serán factor en el tipo de industria (farmacéutica, cosmética y alimentaria) en la que será utilizado. Sus propiedades gelificantes hidratantes, formadora y estabilizadora de emulsiones y espumas, así como su propiedad más importante, la viscoelástica o filmogénica estará determinada por la fuerza del gel o bloom . En esta última propiedad se basa el desarrollo y diseño de envases comestibles debido sus excelentes propiedades (Figuroa-López, 2018; Dangaran, Tomasula y Qi, 2009).



**Figura No. 2.** Estructura de la gelatina -Ala-Gly-Pro-Arg-Gy-Glu-4Hyp-Gly-Pro- (Nur Hanani *et al.*, 2014)

#### 1.6.8.4.1 Propiedades fisicoquímicas de la gelatina que determinan su uso en biopelículas

##### 1.6.8.4.1.1 Fuerza del gel (*bloom*)

Es la resistencia o fuerza del gel y está en función del peso molecular y los componentes de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del tipo de gelatina que se ocupe. Influirá directamente en la viscosidad del gel. Es considerada la propiedad más importante

en la industria, ya que es una buena guía para el comportamiento del gel en los diferentes productos a utilizarse. El *bloom* es definido como el peso requerido para empujar un émbolo cilíndrico de 13 mm de diámetro en 4 mm en un gel previamente preparado. Está representado en un rango de 50 a 300 bloom. Diferentes resistencias del gel son usadas en diferentes aplicaciones en la industria, por ejemplo, en la industria alimentaria gelatina tipo B con una resistencia de 125- 250 bloom es comúnmente usada en la confitería de productos. Otro ejemplo es en el aclareo de jugos y vinos, donde se ocupan gelatinas tipo A con geles de baja resistencia de 70 a 90 bloom (Niehues y Quadri, 2017; Mariod y Fadul, 2015).

#### **1.6.8.4.1.2 Solubilidad**

La gelatina es prácticamente insoluble en alcohol y solventes no polares como sorbitol, manitol y glicerina. La solubilidad de la gelatina se realiza principalmente en agua caliente donde prácticamente pierde su triple enlace, sin embargo, la procedencia de la gelatina y el tipo (A o B) afectan su punto isoeléctrico y su temperatura de fusión. Para gelatina a base de pescado, se requieren una temperatura superior a 45 °C, mientras que la gelatina de cerdo y bovino exige una temperatura superior a 60–65 °C. Por otra parte, las gelatinas tipo A necesitan pH alrededor de 8.0-9.0, mientras que las tipo B, pH de 4.8-5.4. (Coltelli *et al.*, 2015; Mariod y Fadul, 2015).

#### **1.6.8.4.1.3 Viscosidad**

La viscosidad que producen las soluciones de gelatinas es una de las propiedades funcionales más importantes. Las mediciones de viscosidad se leen a partir del tiempo de flujo de una solución de gelatina a través de pipetas calibradas y los resultados son expresados en milipoise. Esta unidad de expresión se calcula a partir de la viscosidad cinética, mediante la siguiente ecuación:  $V = \eta/10 \cdot \rho$ . Donde  $\rho$  tiene un valor de 1.00 y es la densidad de la solución de gelatina al 6.67%. (Mariod y Fadul, 2015; Avena-Bustillos *et al.*, 2006).

#### **1.6.8.4.1.4 Punto de fusión**

El punto de fusión es la temperatura a la que un gel de gelatina se ablanda suficientemente y permite que las gotas de tetracloruro de carbono se hundan a través de él. Factores tales como la temperatura de maduración y la concentración del gel de gelatina tienden a afectar su punto de fusión (Coltelli *et al.*, 2015; Mariod y Fadul, 2015).

#### **1.6.8.4.1.5 Punto de ajuste**

El punto de ajuste de una solución de gelatina depende de su historia térmica y mecánica. Se encuentran temperaturas de ajuste más altas cuando la solución se enfría lentamente en comparación con enfriamiento rápido, impedimentos mecánicos de acción o ajuste de retardo (Coltelli *et al.*, 2015; Mariod y Fadul, 2015).

#### **1.6.8.4.2 Gelatina de residuos animales terrestres**

La gelatina de mamífero se deriva del colágeno que es el constituyente principal de los tejidos conectivos y los huesos de los animales vertebrados. El colágeno generalmente constituye del 20 al 25% de la proteína total de los vertebrados superiores, cuanto más pesado sea un animal, más colágeno posee. Se han reportado al menos cinco tipos de colágeno (I, III, IV y V) de los cuales, los más ocupados se encuentran en las vacas y cerdos, que contienen principalmente colágeno tipo I. Por otro lado, el colágeno presente influye significativamente en la textura del músculo y está influenciado por la edad de los animales. En animales jóvenes es más inestable debido a que los puentes de hidrógeno que los unen están en menor número, en cambio, en animales maduros, el colágeno posee un mayor número de puentes de hidrógeno (que se forman con el tiempo) y por lo tanto una mayor estabilidad (Fennema, 2002).

#### **1.6.8.4.3 Gelatina de residuos de la pesca**

En cuanto los productos que se pueden ocupar para la elaboración de gelatinas provenientes del mar, se pueden encontrar dos principalmente (residuos de peces y de calamar). De los cuales, del 25-30% del producto capturado termina siendo consumido por los humanos, otra pequeña parte se ocupa como harina de pescado y cerca del 60%, se desecha como residuo de nuevo al mar. Lo anterior representa un coste económico o genera un problema medioambiental, dentro de estos

subproductos se encuentran espinas, aletas y pieles de pescado y calamar que se pueden ocupar en la elaboración de gelatinas, con el fin de reducir estas pérdidas. Desde hace ya algunos años se han buscado el desarrollo de productos funcionales de alta calidad para su utilización en la industria de la alimentación o en la industria farmacéutica con el fin de incrementar su valor en el mercado (Avena-Bustillos et al., 2006; Crapo y Bechtel 2003).

En cuanto a las películas que se obtienen de residuos de pescado poseen, éstas buenas propiedades formadoras, ya que son transparentes, poco coloreadas y extensibles. Sin embargo, se tiene que distinguir si provienen de residuos peces de agua fría y dulce como son el salmón o las que provienen de residuos de agua cálida y salada, como son los peces mamíferos ya que presentan características fisicoquímicas totalmente diferentes. La principal desventaja de las gelatinas de pescado, respecto a las de mamífero, es que forman geles menos estables, en especial las procedentes de peces de aguas frías (bacalao, salmón o abadejo), éste hecho está relacionado con el menor número de regiones ricas en prolina e hidroxiprolina en el colágeno comparado con el número existente en los animales de sangre caliente. Por lo cual, se necesitan más investigaciones en diferentes especies de peces para conocer su uso en la industria (Avena-Bustillos et al., 2006; Balian y Bowes 1977).

#### 1.6.8.4.4 Gelatina de insectos

Aunque aún es un campo emergente algunas investigaciones reportan la extracción de gelatina a partir de insectos, como las *Aspongopus viduatus* (chinche del melón) y *Agonoscelis pubescens* (chinche del sorgo) que se ven en la Figura No. 3. Las cuales podrían ser una fuente alternativa para ser aplicada en productos Halal (alimentos aceptables según el Islam). En cuanto a su caracterización contienen alrededor de 27- 28% de proteína cruda compuesta de 16 aminoácidos incluyendo todos los esenciales con proteína de bajo peso molecular (40 kDa), y con 54-57% de grasa de donde se obtiene el aceite. Dicho aceite es antibacteriano y antioxidante, mostrando buenos resultados. Por lo tanto, la gelatina extraída de estos insectos podría considerarse como un producto funcional en la industria alimentaria (Mariod y Fadul, 2015).



**Figura No. 3.** Chinche del sorgo (izquierda) y Chinche del melón (derecha) (Mariod y Fadul, 2015).

#### **1.6.8.5 Lípidos**

La función principal de un recubrimiento lipídico es bloquear el transporte de humedad debido a su polaridad relativamente baja. En contraste, la característica hidrófoba de los lípidos forma películas más gruesas y más frágiles. Por consiguiente, deben asociarse con agentes formadores de película, como proteínas o derivados de celulosa generalmente, la permeabilidad al vapor de agua disminuye cuando aumenta la concentración de la fase de hidrofobicidad. Las películas basadas en lípidos a menudo se apoyan en una matriz de estructura de polímero, generalmente un polisacárido, para proporcionar resistencia mecánica (Pineda, 2014; Bourtoom, 2008).

Dentro de los materiales más utilizados en la formación de películas o recubrimientos de carácter lipídico podemos encontrar aceites, grasas, ceras, mono y diglicéridos acetilados, triglicéridos, ácidos grasos, alcoholes grasos, lecitinas, esteroides de la sacarosa, lacas, barnices, resinas naturales y surfactantes. Estos últimos de alto interés en mejorar las propiedades de barrera de las películas aumentando la hidrofobicidad cuando se adicionan en bases poliméricas de proteínas o polisacáridos (Nur Hanani *et al.*, 2014).

### **1.6.8.6 Surfactantes**

Son compuestos orgánicos que tienen dos diferentes estructuras parciales dentro de sus moléculas. Por una parte, contiene un segmento lipofílico (no polar) y otro hidrofílico (polar). La solubilidad parcial tanto en agua como en aceite permite al surfactante ocupar la interface entre las fases. Los surfactantes usados en la industria alimentaria son: Mono y di glicéridos, ésteres de propilenglicol, ésteres de sorbitan (span 60), ésteres de polioxietileno sorbitan (Tween 20, 60,80; polisorbato 60) (Pineda-Velázquez, 2014; Palacios-Gordillo, 2008).

#### **1.6.8.6.1 Tween 80 y Tween 60**

El Tween 80 también es conocido como polisorbato 80, ayuda a solubilizar y estabilizar las proteínas, forma parte del mismo grupo donde se incluyen al Tween 60, 40 y 20. Los cuáles, son ésteres del ácido graso de los polietoxilatos del sorbitan. Estos se diferencian por el tipo de los ácidos grasos presentes: en el Tween 80 su éster de ácido graso es el oleico y en el Tween 60 es el esteárico., diversos autores, usan los surfactantes como Tween 60 y Tween 80 para mejorar la hidrofobicidad en las películas (Pineda-Velázquez; Miranda *et al.*, 2004).

### **1.6.8.7 Plastificante**

De acuerdo con la definición de las normas (ASTM D 882-02), un plastificante es un material que se incorpora a un plástico para facilitar su procesado y mejorar su



flexibilidad o distensibilidad. La adición de un plastificante en plásticos puede hacer que disminuya la viscosidad en estado fundido, el módulo de elasticidad, y la temperatura de transición vítrea (Tg) de un plástico. La temperatura de transición es un parámetro relacionado con los cambios estructurales de las películas y se utiliza para evaluar el efecto plastificante de los materiales. Los plastificantes son líquidos hidrofílicos de bajo peso molecular y la acción que ejercen resulta de la capacidad de las moléculas en generar puentes de hidrógeno con la red polimérica, dando como resultado un aumento del volumen libre y de movilidad de las cadenas del polímero, lo que por otro lado reduce la temperatura de transición vítrea del material y lleva a obtener películas más flexibles con mayor permeabilidad, aunque con menor resistencia mecánica, variables influenciadas por tipo y cantidad del plastificante. Los plastificantes más comúnmente utilizados son polioles (glicerol, sorbitol y polietilenglicol), azúcares (glucosa y sacarosa) y lípidos (monoglicéridos, fosfolípidos y surfactantes). El uso de plastificantes naturales, como los triglicéridos de los aceites vegetales o los ésteres de ácidos grasos, está aumentando debido a su baja toxicidad y baja migración (Cazón *et al.*, 2017; Pereda *et al.*, 2014).

#### **1.6.9 Empaque activo**

El principio de esta técnica es la incorporación de componentes particulares dentro del polímero sin afectar sus características intrínsecas y posteriormente ocuparlo como vehículo para que pueda proteger al alimento. Los nuevos avances mencionan el uso de envases activos que contienen aditivos que brindan

capacidades antimicrobianas y antioxidantes. Sin embargo, muchas de estas sustancias químicas pueden generar daños al consumidor, un ejemplo son los antioxidantes artificiales como butilhidroxitolueno, compuestos tioéster y organofosforados, los que están limitados en su uso, debido a la toxicidad como resultado de su migración a los productos alimenticios de ahí. La importancia de remplazarlos por el uso de aceites esenciales como extractos naturales obtenidos de hierbas y especias, tocoferol y extractos de plantas que son generalmente reconocidas como seguras, estos compuestos son buenas fuentes de diversos compuestos bioactivos y se utilizan como una excelente forma de embalaje cárnico debido a sus propiedades antimicrobianas (Majid *et al.*, 2016; Rodríguez-Sauceda).

En el sistema de envasado activo, el material antioxidante o antimicrobiano requiere de algunas consideraciones como: que el compuesto debe ser compatible con el material de embalaje y capaz de formar una distribución homogénea, además tomar en cuenta el tipo de alimento por sus características particulares de conservación (Majid *et al.*, 2016; Rodríguez-Sauceda).

### **1.6.9.1 Principales métodos de caracterización de biopelículas**

#### **1.6.9.1.1 Propiedades Mecánicas**

Las propiedades mecánicas, incluida la resistencia a la tracción (TS), el porcentaje de alargamiento a la rotura (% E) y el módulo de Young, son propiedades mecánicas de las películas comestibles que pueden ser usadas para describir el comportamiento del material. Sin embargo, estas propiedades pueden variar según

el grosor de la muestra, método de preparación, velocidad de la prueba, tipo de agarre utilizado y la forma de medir la extensión (ASTM D 882 – 02). Estas propiedades son importantes cuando las películas de empaque están diseñadas para resistir el estrés externo, mientras mantienen su integridad. La medición de estas propiedades permite predecir cómo se comportará el material en diferentes condiciones de procesamiento de alimentos y compararlo con los polímeros comerciales.

La fuerza tensil, dureza o resistencia a la tracción es la fuerza máxima por área que una película puede soportar antes de romperse. Se obtiene dividiendo la fuerza máxima entre el área transversal de la película y se calcula a partir de resultados de prueba de tracción y utilizando la ecuación siguiente (Wang *et al.*, 2017; Cazón *et al.*, 2017)

$$T = F / (L * X)$$

Donde F es la Fuerza tensil (N), L es el ancho de la película (mm) y X el grosor en (mm).

La elongación es el porcentaje de cambio máximo en longitud de la película antes de romperse, a menor porcentaje de elongación menor flexibilidad. Se calcula mediante la siguiente ecuación (Wang *et al.*, 2017).

$$\%E = 100 * (L_0 - L_1) / L_1$$

Donde  $L_1$  es la longitud inicial y  $L_0$  es la longitud de la película en el punto de ruptura

En un estudio realizado por Wang *et al.* (2007) a distintas concentraciones de proteínas y polisacáridos para la formación de películas comestibles, se determinó que en general las películas formuladas con polisacáridos tienen mayores valores de fuerza tensil en comparación con las películas formuladas con proteínas. Sin embargo, las películas con polisacáridos tienen menores valores de porcentaje de elongación. Por ejemplo, las películas de gelatina al 8% presentaron una fuerza tensil de 6.60 MPa y un porcentaje de elongación de 89.69%, mientras que con películas formuladas con carboximetilcelulosa al 2% se obtuvieron valores de 11.25 MPa de fuerza tensil y 10.53% de elongación.

#### **1.6.9.2 Propiedades ópticas de biopelículas**

La determinación de propiedades ópticas en un material mediante el uso de técnicas espectrofotométricas o con colorímetros nos permite conocer las variaciones en su coloración y transparencia según la formulación. Lo cual, es un parámetro muy importante en materiales que vayan a ser utilizados en envasado de alimentos, al tomar en cuenta que los plásticos convencionales son incoloros y translúcidos, con lo que cualquier presencia de color puede afectar la aceptabilidad del producto. En cuanto a las películas activas, esta es una de las características más importantes ya que se adicionan aceites esenciales o extractos los cuales pueden transferir

alguna coloración dependiendo su origen. La cual, puede llegar afectar la imagen del producto.

Para realizar mediciones de color normalmente se ocupan colorímetros, ocupando el sistema CIE L\*a\*b\* (L\* luminosidad, a\* rojos y b\* amarillos) y se reporta la diferencia de color entre las muestras y un parámetro de un blanco de referencia (papel blanco) (Cazón *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son la diferencia entre los parámetros correspondientes a color de cada muestra y el estándar que es el papel de color blanco que se usó como fondo al tomar las mediciones ( $L^*= 93.68$ ,  $a^*=1.93$ ,  $b^*=-1.87$ ).

### **1.6.9.3 Transparencia**

La transparencia es determinada mediante la siguiente fórmula

$$T = \frac{A_{600}}{M}$$

Donde  $A_{600}$  es la absorbancia a 600 nm y  $M$  es el espesor de la película (mm). Los valores más altos de transparencia representan una menor transparencia de la película (Cazón *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

#### **1.6.9.4 Propiedades de barrera a los gases**

Las propiedades de barrera de una película polimérica son cruciales para estimar o predecir la vida útil del producto. Comúnmente, los plásticos son relativamente permeables a pequeñas moléculas como gases, vapor de agua, vapores orgánicos o líquidos. El vapor de agua y el oxígeno son dos de los compuestos principales, pueden transferirse desde el ambiente interno o externo a través de la pared del paquete de polímero, lo que resulta en un cambio continuo en la calidad del producto que disminuye la vida útil (Cazón *et al.*, 2017; Siracusa *et al.*, 2008)

#### **1.6.9.5 Propiedades de barrera al oxígeno**

Una de las propiedades más importantes cuando se trata de diseñar un sistema para envasado de alimentos es la permeabilidad a los gases, en particular al oxígeno, este gas es capaz de participar en reacciones químicas perjudiciales para los alimentos y por eso su presencia debe estar limitada por el material de envase en la mayor parte de los casos (Figuroa-López *et al.*, 2018).

Para la determinación de la velocidad de transferencia de cualquier gas a través de una película de un material polimérico se debe tener en cuenta la segunda ley de Fick:

$$Q = D \cdot A \cdot t \cdot (c_1 - c_2) / e$$

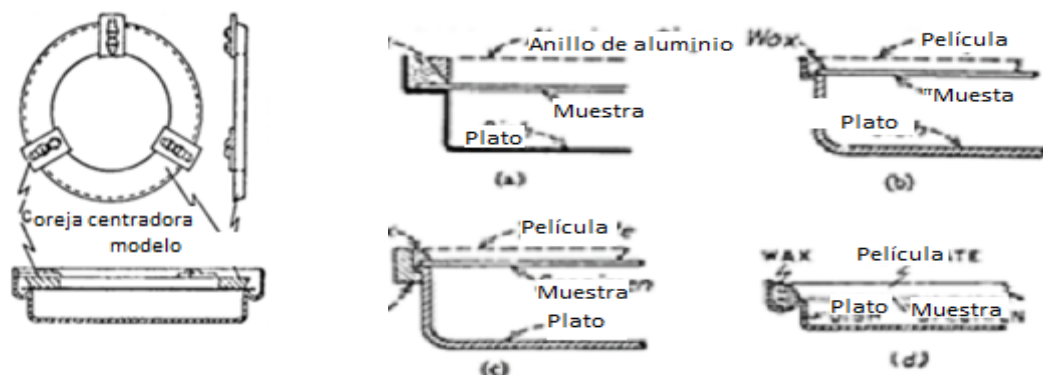
Esta ecuación relaciona la cantidad de gas que atraviesa el material ( $Q$ ), con el área de la película ( $A$ ), el tiempo de contacto ( $t$ ), la diferencia de concentración permeante entre las dos caras de la película ( $C_1-C_2$ ) y su espesor ( $e$ ). El coeficiente de difusión ( $D$ ) se considera como una constante de proporcionalidad y es una medida de la velocidad con que las moléculas atraviesan el film polimérico.

#### **1.6.9.6 Propiedades de barrera al vapor de agua**

La permeabilidad al vapor de agua, es considerada la tasa de tiempo de transmisión del vapor de agua a través del área de la unidad de material plano o construcción inducida por la diferencia de presión de vapor de la unidad entre dos superficies específicas, bajo condiciones de temperatura y humedad específicas (Figura No. 4). La norma ASTM E 96 – 05, reporta dos métodos para calcular la permeabilidad de un material donde la diferencia de presión de vapor es nominalmente la misma en ambos métodos, excepto en la variación, con extremos de humedad en lados opuestos:

- Método desecante: en este método la muestra se sella a la boca abierta de copas de aluminio las cuales contienen un desecante (Sulfato de calcio anhidro) y en conjunto se coloca en una atmósfera controlada. Lo cual se realiza por pesajes periódicos los cuales, determinan la velocidad del movimiento de vapor de agua a través de la película en el desecante (ASTM E 96 – 05).

- Método de agua: en este método la muestra se sella a la boca abierta de copas de aluminio. Las cuales contienen agua destilada y en conjunto se colocan en una atmósfera controlada. Los pesajes determinan la velocidad de movimiento del vapor a través de la muestra desde el agua hasta la atmósfera controlada (ASTM E 96 – 05).



**Figura No. 4.** Copa de aluminio para realizar pruebas de permeabilidad al vapor de agua (ASTM E 96 – 05)

#### 1.6.9.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las biopelículas

Esta técnica permite el análisis microscópico de los polímeros con una alta resolución mediante un bombardeo de electrones de alta energía que barren la superficie del material (Arrieta *et al.*, 2011).

En un microscopio electrónico de barrido la imagen se obtiene a partir de las señales emitidas por la muestra y se va formando a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie. Este barrido (*scanning*) se realiza línea



por línea sobre una pequeña zona de forma rectangular (*raster*). Esta zona es la que se visualiza amplificada en la imagen final. A medida que el haz explora la muestra, la intensidad de la señal generada varía según el punto particular analizado en cada instante. La señal detectada es analizada y amplificada, tanto en su forma analógica como digital, y finalmente procesada (Ipohorski y Bozzano, 2013; Arrieta *et al.*, 2011).

A diferencia de una imagen óptica, el microscopio electrónico de barrido no forma una imagen real del objeto, sino que construye una imagen virtual a partir de alguna de las señales emitidas por la muestra. La imagen se visualiza en un tubo de rayos catódicos donde las bobinas de deflexión del haz están sincronizadas con el barrido del haz de electrones en el microscopio. Modulando la intensidad del haz del tubo de rayos catódicos se obtiene finalmente un registro punto a punto en la pantalla que es precisamente, la imagen electrónica proporcionada por el microscopio. Actualmente, la visualización se realiza en una computadora (Ipohorski y Bozzano, 2013; Arrieta *et al.*, 2011).

#### **1.6.9.8 La Termogravimetría**

Es una técnica analítica que determina la pérdida de peso de una muestra en función de la temperatura o el tiempo. Lo que permite asociar dichos cambios a determinados procesos de degradación. La medición se lleva a cabo en atmósferas perfectamente definidas, habitualmente nitrógeno (condiciones inertes) o bien en

aire u oxígeno (condiciones oxidativas). La masa de la muestra sometida a un programa de temperaturas queda registrada por una balanza de alta sensibilidad en cada instante. Ésta es una de las principales técnicas que se utilizan en el análisis de polímeros, sobre todo para estudiar el comportamiento a altas temperaturas, y se han descrito un amplio número de aplicaciones en numerosos materiales: comparación de estabilidades térmicas relativas, efecto de los aditivos en la resistencia térmica del polímero y estudios sobre cinéticas de degradación (Balart-Gimeno, 2003).

#### **1.6.9.9 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Esta técnica se basa en el registro de la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la muestra y un material inerte de referencia sometidos ambos al mismo programa de temperaturas. La diferencia de energía registrada por el instrumento es equivalente a la energía térmica absorbida o disipada en el curso de una transición por parte del material. En ese momento se registran los desplazamientos desde la línea base en el termograma para dicha transición, cuya área es proporcional a la variación entálpica asociada. Los cambios en la temperatura de la muestra son debidos a transiciones entálpicas, endotérmicas o exotérmicas, y se relacionan con cambios estructurales o de fase en el material. Entre los procesos físicos con transiciones de fase endotérmicas se incluyen la fusión, vaporización, sublimación y desorción. La absorción y adsorción suelen ser procesos endotérmicos, mientras que las transiciones cristalinas pueden

ser tanto exotérmicas como endotérmicas. Lo más habitual en polímeros es que los procesos de cristalización impliquen un cambio energético de carácter exotérmico (Balart-Gimeno, 2003).

#### **1.6.10 Principales sustancias de las plantas que le dan actividad antimicrobiana o antioxidante**

#### **1.6.11 Capacidad antimicrobiana o antioxidante de productos vegetales naturales**

Los recursos naturales como las plantas contienen compuestos químicos que se pueden obtener de sus diferentes partes como: cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas. Los cuales, gracias a la composición de sus metabolitos secundarios principalmente fenoles o saponinas le brindan la capacidad antimicrobiana o antioxidante. El modo de acción de éstos metabolitos no ha sido determinado con exactitud, pero se conocen tres mecanismos que pueden efectuar la acción sobre el microorganismo (inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular, daño a la integridad de las membranas e Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que otros factores pueden afectar la acción antimicrobiana de estos productos como son las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura del producto a conservar. Por otra parte, a los componentes activos. Los productos vegetales (metabolitos) pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización

geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas variando con ello también la capacidad antimicrobiana (Sauceda y Nereyda, 2011, Mussel, 1983).

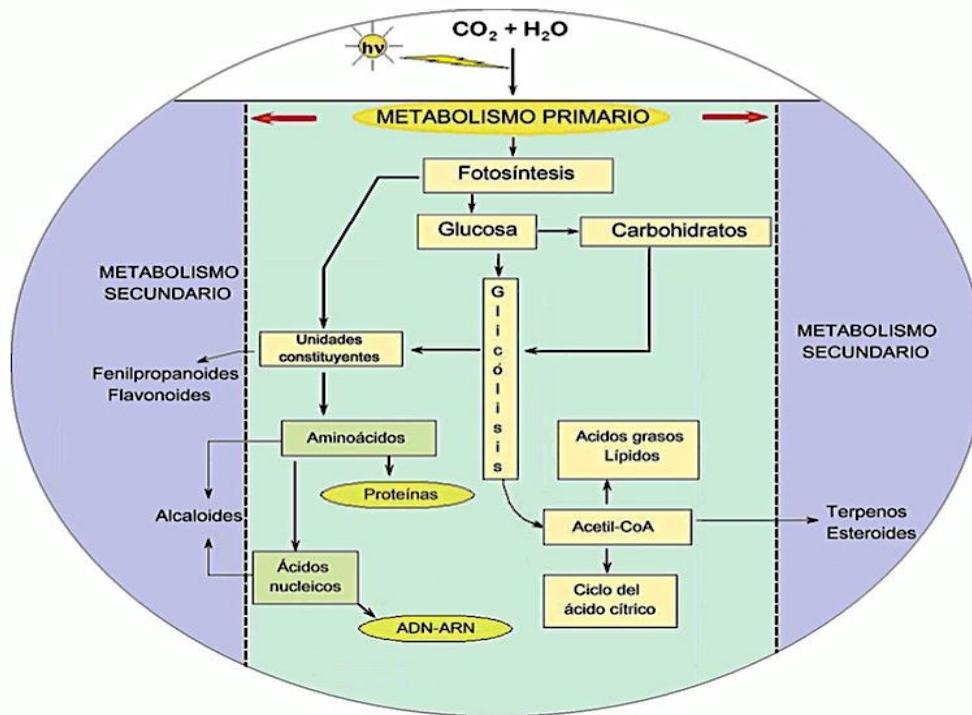
#### **1.6.11.1 Metabolitos**

El término metabolito está restringido a moléculas pequeñas, dentro de las funciones que desarrollan se encuentran el combustible, la estructura, la señalización, los efectos estimulantes e inhibidores de enzimas, la actividad catalítica propia (usualmente como cofactores de una enzima), la defensa y las interacciones con otros organismos. En las plantas el carbono, nitrógeno y la mayor parte de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y terminan desempeñando las mismas funciones (Tiwari y Rana, 2015, Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

##### **1.6.11.1.1 Metabolitos primarios**

Se denominan metabolitos primarios (Figura. No. 5) a las sustancias bioquímicas como hidratos de carbono, proteínas y lípidos que están directamente relacionadas con las funciones vitales de la planta (fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, lípidos o carbohidratos)

funciones esenciales para el crecimiento desarrollo y reproducción de la planta (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).



**Figura No. 5.** Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas. (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009)

### 1.6.11.1.2 Metabolitos secundarios

Se denominan metabolitos secundarios a las sustancias químicas que no interfieren en las funciones principales del organismo de crecimiento y desarrollo y no se sintetizan a través de vías metabólicas comunes, los metabolitos primarios. Sin embargo, pueden ser metabolizados de ellos. Los metabolitos secundarios son sustancias que son producidas por las plantas como defensa. Su ausencia no causa malos efectos a las plantas. Incluyen alcaloides, compuestos fenólicos, esteroides,

aceites esenciales, ligninas, resinas, taninos, entre otros. Las plantas sintetizan alrededor de pequeñas cantidades (1%-2%) estando a menudo su producción restringida a cierto género de plantas, familias o especies taxonómicas (Irchhaiya *et al.*, 2015). Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales o insectos, muchos son pigmentos que proporcionan color a las flores y frutos, jugando un papel esencial en la polinización otros compuestos. Tienen funciones protectoras frente a depredadores, actuando como repelentes, al proporcionar a la planta sabores amargos haciéndolas difícil de digerir o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos, actuando como pesticidas naturales. Sin embargo, estos metabolitos secundarios se sintetizan en células especializadas en etapas de desarrollo particulares, dificultando la extracción y purificación (Tiwari, y Rana, 2015, Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

#### **1.6.11.1.2.1 Importancia industrial de los metabolitos secundarios**

Uno de los principales usos de metabolitos secundarios es como medicina alternativa, El 80% de la población mundial se basa en los medicamentos tradicionales para la atención primaria de salud y la mayoría de los cuales implican el uso de extractos de plantas. Por otra parte, en otras industrias como la de cosméticos, alimenticia y farmacéutica actualmente se ocupan como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes,

conservantes y antioxidantes (Irchhaiya *et al.*, 2015, Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

#### **1.6.11.1.2.2 Clasificación de metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios pueden ser clasificados en función de la estructura química, por ejemplo, la cantidad de anillos que contienen, composición (si contiene nitrógeno o no), su solubilidad en diversos solventes o la vía por la que se sintetizan (ejemplo fenilpropanoide, que produce taninos), pero en general se clasifican principalmente por sus rutas biocinéticas y se consideran tres grupos principales (Vargas-Álvarez *et al.*, 2006), que son:

1. Terpenoides.
2. Flavonoides y compuestos fenólicos y polifenólicos aliados.
3. Alcaloides que contienen nitrógeno y compuestos que contienen azufre.

#### **1.6.11.1.2.3 Flavonoides y compuestos fenólicos y polifenólicos aliados,**

En varias especies los flavonoides varían sustancialmente entre genotipos, cambios estacionales, edades y daños de la hoja y sitios de ubicación. Las hojas jóvenes son la fuente principal de compuestos fenólicos, porque los sintetizan como defensa contra predadores herbívoros que las prefieren por su mayor calidad nutricional

respecto a las hojas maduras. Sin embargo, eso no siempre ocurre porque no todos los metabolitos tienen el mismo comportamiento durante el desarrollo foliar. Por ejemplo, los flavonoides aumentan conforme avanza el desarrollo de la hoja (Vargas-Álvarez *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos (Figura No. 6) se encuentran en plantas comestibles y no comestibles, y se ha informado que tienen múltiples efectos biológicos, incluidos actividad antioxidante y antimicrobiana. Extractos crudos de frutas, hierbas, vegetales, cereales y otros materiales vegetales ricos en fenoles son cada vez más interesantes en la industria alimentaria porque retardan la degradación oxidativa de los lípidos y controlan la proliferación de algunos microorganismos aumentando con ello la calidad e inocuidad de los alimentos (Kähkönen *et al.*, 1999).



Estructura química	Tipo	Ejemplo de polifenol
$C_6$	Fenol simple	Eugenol
$C_6-C_1$	Ácido fenólico Ácido benzoico	Ácido gálico Ácido elágico
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizables	
$C_6-C_2$	Ácido fenil acético	
$C_6-C_3$	Ácido hidroxicinámico Cumarinas	Ácido cafeico Ácido ferúlico
$(C_6-C_3)_2$	Lignanós	
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenonas Xantonas	
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos	Resveratrol
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides  Chalconas	Antocianinas Flavonoles Flavonas Flavanonas Isoflavonas Flavanoles
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proantocianinas (taninos $4 \leq n \leq 11$ )	

**Figura No. 6.** Clasificación de los polifenoles y ejemplos de ellos (García et al, 2015).

### 1.6.12 Propiedades de la hoja del árbol de guayaba

La guayaba (*Psidium Guajava* L.) es miembro de la familia Myrtaceae, que contiene al menos 133 géneros y más de 3800 especies. Es nativo de América tropical y ha sido naturalizada en el sureste de Asia. Diferentes partes de la planta se utilizan en el sistema tradicional de medicina para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas diabetes mellitus, diarrea, tos e hipertensión. También se utiliza para tratar el acné, la menstruación dolorosa, infección de boca y dolor de garganta. Así

como un desinfectante para heridas, y como antiséptico contra úlceras, bronquitis, llagas oculares, intestinos y cólera (Souza *et al.*, 2011, Begum *et al.*, 2004).

#### **1.6.12.1 Capacidad antimicrobiana de hoja de guayaba**

Dentro de investigaciones Gonçalves, *et al* (2008), en un trabajo realizado con cuatro diferentes métodos de extracción, reportan inhibición de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Salmonella* ppt. cuando fueron sometidas al aceite esencial y extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de hojas de guayaba. Así como se inhibió a *Salmonella anatum* con el aceite esencial y extracto metanólico de hojas. De igual manera en otra investigación en la cual, hicieron una comparación de conformación de aceites esenciales y capacidad antimicrobiana de tres especies de la misma familia reportaron que para el caso de las hojas, encontraron que inhibieron *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* a una concentración de 2 y 8 % del extracto hidroalcohólico de hoja. A si mismo también realizaron la caracterización de los compuestos de las hojas: cimeno, limoneno, terpinen-4-ol, terpineol,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -caryophylleno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, alloaromadendreno,  $\gamma$ -muuroleno  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -selineno, óxido de caryophylleno y viridiflorol (Souza *et al.*, 2011). Por otra parte, en un trabajo con extracto alcohólico al 40% también de hojas, se encontró capacidad antimicrobiana similar a un 30% en comparación con un control positivo de (estreptomina (10 mg/ml), frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeuriginosa* (Martínez *et al.*, 1997).

### **1.6.12.2 Capacidad antioxidante de hojas de guayaba**

La guayaba ha sido objeto de varias investigaciones sobre actividad biológica. ha mostrado que tanto la fruta, como la hoja son fuentes de flavonoides, polifenoles y otras sustancias bioactivas. Adicionalmente, en las hojas se han encontrado ácidos fenólicos tales como el ferúlico, a los cuales se les atribuye su mayor capacidad antioxidante. Rodríguez *et al.*, ( 2012), en su investigación reporto la capacidad antioxidante (ORAC) del extracto de guayaba contra la oxidación lipídica por acción de la radiación UV en un 43 % y capacidad antioxidante de (0,7  $\mu\text{mol Trolox}^{\circledR}/\text{mg}$ ). Además presentaron como compuestos mayoritarios trans- $\beta$ -cariofileno (12.8 %), seguido de  $\alpha$ - y  $\beta$ -selinenos (7.0 % y 6.9 %). Por su parte Ordoñez *et al.*, (2011) reporta que se encontró capacidad de inhibición ante el radical DPPH en hojas tiernas de variedades rosada de guayaba IC<sub>50</sub> de  $14,086 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$  y en la blanca IC<sub>50</sub>  $15,463 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$  en un trabajo de cuantificación de fenoles y capacidad antioxidante en varias partes vegetativas de (*Psidium Guajava* Linn).

### **1.6.12.3 Composición de hojas de guayaba**

Las hojas de esta planta contienen un aceite esencial rico en taninos, fenoles, flavonoides, triterpenos, esteroides, así como de saponinas y compuestos aminados. Los principales reportados fueron catególico, guayavólico aromandreno, 3-bisaboleno, cariofileno, nerolidiol, ácido guajanoico,  $\beta$ - sitosterol, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico; ácido 2-á-hidroxiursólico, morin-3- O-á-L-

arabopiranosido, hiperina, miricetina-3-O- $\beta$ -D-glucosido, quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronopiranosido, 1-O-galoil- $\beta$ -D-glucosa, encontraron p-cimeno, limoneno, terpinen-4-ol  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -caryophylleno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, alloaromadendreno,  $\gamma$ -muuroleno  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -selineno, óxido de caryophylleno y viridifloro, (Rodríguez *et al.*, 2013, Souza *et al.*, 2011). Además de un compuesto que reporta Begum *et al.*, (2004), como ácido 3-p-E-coumaroiloxi-2-metoxiuros-12-en-28-óico.

### **1.6.13 Propiedades del árbol de Aguacate**

El Aguacate (*Persea americana* Mill) (familia: Lauraceae), es un árbol perene, caducifolio de 15 a 20 metros es originario de América Central (México) de alto valor económico por la comercialización de sus frutos, en muchos partes del mundo soy muy valorados estos frutos ya su aceite es rico en ácidos grasos *monosaturados* y polinsaturado, es rica en carbohidratos, proteínas, vitamina A y B. Además de sus frutos, las hojas y otras partes morfológicas poseen propiedades medicinales y se usan ampliamente en la medicina tradicional donde sus principales usos son como diuréticos, control de la presión, antidiabético, analgésico, antiinflamatorio, anemia, insomnio, hiper-lipodemia, diarrea, disteria, gastritis, úlceras, bronquitis, hepatitis (Ojewole y Amabeoku, 2006).

#### **1.6.13.1 Capacidad antimicrobiana de hojas de aguacate**

En una investigación sobre la eficacia de extractos metanólicos de hojas de aguacate y otras plantas demuestran que la hoja de aguacate muestra capacidad mínima inhibitoria a 125 µg/mL contra cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv (Gómez-Flores *et al.*, 2008). Por otra parte Rodríguez *et al.*, (2011), realizó una investigación donde midió la capacidad antimicrobiana de la cáscara, pulpa y semilla de dos variedades de aguacate (Hass y Fuerte) donde se reportó la inhibición en contra de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, en pulpa de la variedad fuerte. Además, se encontró capacidad inhibitoria para *Pseudomonas* spp. e *Yarrowia lipolytica* con el extracto de la cáscara de la variedad Hass.

#### **1.6.14 Propiedades de las hojas del árbol de ciruela roja**

La ciruela roja (*Prunus cerasifera*) pertenece a la familia Rosaceae. Es una especie de árbol ornamental y es conocida como la ciruela de hojas moradas, debido a la coloración que presentan sus hojas purpuras o rojas todo el año. Las hojas de *P. cerasifera* son ricas en componentes bioactivos, tales como compuestos fenólicos, ácidos, flavonoides y saponinas. Sus extractos poseen capacidad antioxidante. La hoja es también una excelente fuente de pigmentos naturales comestibles y las antocianinas son el principal constituyente de los pigmentos rojos (Chen *et al.*, 2018).

## **1.6.15 Caracterización de compuestos bioactivos de residuos agroindustriales**

### **1.6.15.1 Fenoles Totales por el método de Folin- Ciocalteu**

El ensayo Folin-Ciocalteu mide el contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido) de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido de polifenoles (García *et al.*, 2015).

### **1.6.15.2 Saponinas**

Las saponinas son glicósidos hidrosolubles y pueden tener un esqueleto tipo esteroideal (de base gonano) o de tipo triterpenoide (derivados del escualeno). Las cuales, dan lugar a las dos grandes familias de estos metabolitos: las saponinas esteroidales y las saponinas triterpénicas (Valencia *et al.*, 2005).

- **Las saponinas esteroidales**, se localizan en monocotiledóneas principalmente, de las familias de las Liliáceas, Amarilidáceas y

Dioscoreáceas y las Triterpénicas en éstas y en algunas dicotiledóneas. Las sapogeninas esteroidales siempre se encuentran en la naturaleza formando parte de una saponina. Cabe destacar aquéllas que tienen como aglicona a la hecogenina y la diosgenina, compuestos vegetales que sirven de base para la industria de hormonas esteroidales (Valencia *et al.*, 2005).

**Las sapogeninas triterpénicas** están ampliamente distribuidas en los reinos vegetal y animal. Se presentan en tres estructuras químicas diferentes (30-45 carbonos): acíclicas como el escualeno, considerado como el precursor natural de esta familia, tetracíclicas como el panaxadiol y pentacíclicas, como la estallogenina. Estas sustancias pueden presentarse en sus fuentes naturales: en forma libre: formando ésteres, o como parte de un glucósido (saponina) (Valencia *et al.*, 2005).

Dentro de sus cualidades tienen propiedades tensoactivas y hemolíticas, ambas atribuidas a sus características estructurales de naturaleza anfifílica. Estos metabolitos también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica, destacándose su efecto insecticida, antiprotozoos, antiinflamatorio, antitrichomonas, antiagregante plaquetario, broncolítico, y hipocolesterolémico, así como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias. Estos informes sitúan a las saponinas del generó *Sapindus* L. entre los metabolitos secundarios con elevado valor farmacológico (Valdés *et al.*, 2015; Suhagia *et al.*, 2011).

### **1.6.15.3 Capacidad antioxidante**

Los antioxidantes son moléculas nucleofílicas con gran afinidad y que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas (electrofílicas). Es decir, ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas nucleofílicas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Una vez que los radicales libres reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante. Se pueden dividir en antioxidantes endógenos, como el glutatión, NADPH, albúmina, ácido úrico, coenzima Q, bilirrubina y la melatonina. Así como, en antioxidantes exógenos: la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el  $\beta$ -caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los ácidos egálicos, los flavonoides, la quercitina, la hesperidina, las catequinas y los taninos, estos últimos presentes en especies vegetales (Quintanar y Calderón, 2009).

### **1.6.15.4 Principales métodos para medir capacidad antioxidante**

La mayoría de los métodos para determinar capacidad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema biológico. Existen diferentes métodos complementarios, que evalúan diversos mecanismos de acción, los métodos más



utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, las que se presentan a continuación son (Mercado-Mercado) *et al.*, 2013).

#### **1.6.15.4.1 Poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés (FRAP)**

Se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico al estado ferroso. En dicha forma, ese ion forma un complejo coloreado con el compuesto 2, 4, 6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ). Por tanto, se considera un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones (Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

#### **1.6.15.4.2 Depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

El DPPH es un radical libre estable soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno, principalmente. Este proceso ocurre a través de una reacción de primer orden en la que se puede seguir midiendo la disminución de la absorbancia en función de tiempo. Al solo poderse disolver en medios orgánicos mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares y presenta un pico de absorbancia a 515 nm. El cual puede ser leído con espectrofotómetro (Guija-poma *et al.*, 2015; Mercado-Mercado *et al.*, 2013).

#### **1.6.15.4.3 Depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico ABTS**

También conocido como TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox, por sus siglas en inglés). Se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos y es generado tras una reacción química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica. Su mecanismo de neutralización es principalmente, por transferencia de electrones además de que tiene la ventaja de tener un espectro máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Mercado *et al.*, 2013; Kuskoski *et al.*, 2005).

#### **1.6.15.5 Capacidad antimicrobiana**

##### **1.6.15.5.1 Mecanismos de acción de productos vegetales contra microorganismo**

Los mecanismos de acción de los compuestos naturales están relacionados con la desintegración de la membrana citoplásmica, la desestabilización de la fuerza motriz del protón en el flujo de electrones, transporte activo y de la coagulación del contenido celular. Los mecanismos de acción de los compuestos fitoquímicos están definidos de acuerdo a la acción en la estructura bacteriana en donde se encontró la interacción con componentes citoplasmáticos e interacción con componentes

celulares externos. Éstos últimos son más comunes y se describen continuación conforme al grupo de bacterias que ataca (Sánchez., 2012).

#### **1.6.15.5.1.1 Capacidad inhibitoria en contra Bacterias Gram negativas:**

Uno de los principales efectos de los compuestos fitoquímicos que se han reportado en la célula bacteriana es el cambio producido en la hidrofobicidad celular. Ejemplo de esto, la naturaleza de los compuestos fenólicos son hidrofóbicos y son activos en contra de las membranas celulares. Por otra parte se ha observado que los aceites esenciales de plantas (orégano, tomillo y árbol del té) o sus constituyentes fenólicos (carvacrol, eugenol y timol) actúan contra patógenos bacterianos y levaduras. De modo que estos compuestos afectan la membrana celular resultando en una pérdida en el control quimiosmótico y por lo tanto la muerte celular (Sánchez., 2012).

#### **1.6.15.5.1.2 Capacidad inhibitoria de Bacterias Gram positivas:**

Los compuestos fitoquímicos tales como los fenoles y alcoholes son pequeñas moléculas que se ha visto pueden penetrar a la célula de estas bacterias y desestabilizar la membrana citoplasmática. Lo cual, altera la barrera de la permeabilidad originando la liberación de componentes intracelulares como potasio, fosfatos inorgánicos, proteínas y ácidos nucleicos, lo cuales ocasionan un efecto bacteriostático. También puede haber disipación de protones que alteran el

transporte activo, fosforilación oxidativa y por consiguiente la síntesis de ATP en bacterias. Además interactúan con organelos citoplásmicos como los ribosomas los cuales son responsables de la traducción de ARN mensajero (Sánchez., 2012).

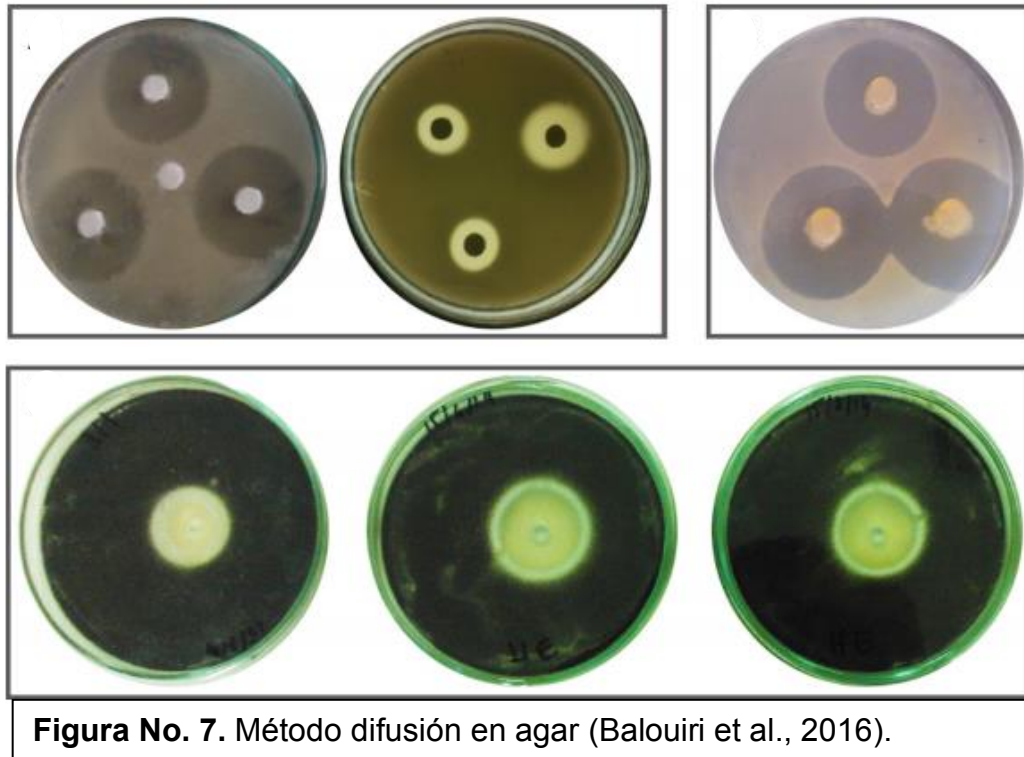
Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son una técnica esencial en muchas disciplinas de la ciencia, y son el primer paso hacia la búsqueda de nuevos antimicrobianos con amplio espectro de inhibición. Existen diferentes métodos de laboratorio para determinar *in vitro* la susceptibilidad de microorganismos ante agentes microbianos donde los resultados son influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto volátil. Sin embargo, los dos métodos más ocupados son los de difusión en papel o en pozo para estudiar compuestos polares y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (CLSI, 2012; Andrews 2001).

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la técnica que reporta el instituto estándar de laboratorios clínicos (CLSI) por sus siglas en inglés, indican que existen una serie de recomendaciones mínimas a tomar en cuenta, como son la concentración bacteriana a utilizar. Mismo que se considera en  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, que equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland. Es recomendable también considerar el inóculo de los cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar cuatro o cinco colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas. En cuanto a los medios de cultivo se recomienda usar el agar Mueller Hinton y agar tripticasa

soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Sin embargo, se pueden ocupar otros medios siempre que cumplan con las características idóneas para el crecimiento de los microorganismos a analizar (CLSI, 2012; Andrews 2001).

#### **1.6.15.5.1.3 Método de Difusión en Agar**

Esta técnica fue desarrollada en 1940 y es considerada un método oficial ocupado en muchos laboratorios para realizar la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. El fundamento es establecer en forma cualitativa, el efecto de un conjunto de sustancias ensayadas individualmente, sobre cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. La técnica se basa en inocular las cajas de agar con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba, posteriormente en la superficie de este medio se colocan discos de papel de aproximadamente 6 mm de diámetro. Los cuales, contienen el compuesto a prueba a una concentración deseada. Posteriormente, las cajas Petri se incuban en las condiciones adecuadas. El agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba y luego en él, se miden los diámetros de las zonas de crecimiento de inhibición, como se muestra en la Figura No. 7 (Balouiri *et al.*, 2016; CLSI, 2012).



#### 1.6.15.5.1.4 Método de Dilución en Agar

El método de dilución en agar o en caldo como prueba de susceptibilidad antimicrobiana es utilizado para determinación de los valores de la capacidad mínima inhibitoria (MIC). Ofrece la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizado en el agar (dilución de agar) o medio de caldo (microdilución) (Figura No. 8). Se puede usar el método de dilución en caldo o en agar para medir cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos. El valor de MIC registrado se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado que inhibe el crecimiento visible del microorganismo, y generalmente se expresa en  $\mu\text{g/mL}$  o  $\text{mg/L}$ . Existen muchas

pautas aprobadas para la dilución de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias exigentes o no exigentes, levaduras y hongos filamentosos. Los estándares más reconocidos los proporciona el CLSI y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (Balouiri *et al.*, 2016; Andrews 2001)



**Figura No. 8.** Técnica de dilución en microplacas (Balouiri *et al.*, 2016).

## 2 JUSTIFICACIÓN

La carne es un alimento esencial en la alimentación humana, principalmente por su alto valor proteico, además de que aporta vitaminas y minerales. Este alimento es vendido principalmente en centros comerciales y es empacado en charolas de unicel cubierto con películas plásticas. Estas limitan su uso a un tiempo muy reducido, que representa un problema, ya que son plásticos no biodegradables, provenientes del petróleo. Estos materiales han afectado de manera negativa la flora y fauna de los ecosistemas del mundo. Principalmente, ambientes marítimos donde comúnmente se depositan. Por otra parte, la quema de estos residuos genera sustancias tóxicas para la salud que además afectan la capa de ozono. Aunado a lo anterior, se han encontrado investigaciones que estos plásticos contienen aditivos tóxicos en su composición. Los cuales, pueden migrar al alimento y generar daños a la salud del consumidor. De lo anterior, la importancia de generar plásticos provenientes de fuentes renovables que sean amigables con el medio ambiente y con el ser humano.

La grenetina y quitosano son compuestos naturales con buenas propiedades fisicoquímicas para formar bioplásticos y han mostrado ser una buena base polimérica para adicionar extractos o aceites esenciales de plantas. Tales pueden adicionar capacidad antimicrobiana o antioxidante al estar a en contacto con la carne y con ello aumentar la vida útil de este producto sin afectar el medio ambiente o la salud del consumidor.



### **3 HIPÓTESIS**

El uso en carne de una biopelícula activa, elaborada con desechos agroindustriales mantiene la inocuidad y las características fisicoquímicas, de dicho producto por un lapso mayor de tiempo en vida útil.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Desarrollar una biopelícula activa con desechos agroindustriales que aumente la vida útil de carne bovina.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar el efecto antimicrobiano y antioxidante de 3 residuos agroindustriales (hoja de guayaba, hoja de ciruela, hoja de aguacate).
- Desarrollar y caracterizar una biopelícula y una biopelícula activa a base de gelatina-quitosano.
- Determinar el efecto de una biopelícula y una biopelícula activa sobre características físicas y microbiológicas en vida de anaquel de carne bovina.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Sitio Experimental**

La presente investigación, mayoritariamente se realizó en el Laboratorio “Calidad de los Productos Agropecuarios” perteneciente a la FCAgrí, UAEMex.

Los análisis de microbiología se llevaron a cabo en el “Laboratorio de Microbiología de los alimentos” en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimento (UNIDA) del Instituto Tecnológico de Veracruz.

Los análisis de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nanomateriales del Centro de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM.

### **5.2 Diseño Experimental**

El diseño experimental estuvo dividido en tres partes. La primera la caracterización de residuos agroindustriales, seguido del desarrollo y caracterización de la biopelícula. Finalmente el, análisis de vida útil de carne con biopelículas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### **5.3 Caracterización de residuos agroindustriales**

- Para medir la capacidad antimicrobiana y antioxidante de los tres residuos agroindustriales analizados se realizó un diseño Multifactorial 3 x 3

completamente al azar. Para lo cual, se consideró los tres residuos agroindustriales *Persea americana* Mill, *Prunus cerasifer*, Ehrh y *Psidium guajava* L) y las tres concentraciones de los extractos hidroalcohólicos etanol:agua v/v (20:80, 50:50 y 80:20).

#### **5.4 Desarrollo y caracterización de la biopelícula**

- Para el desarrollo de la biopelícula se ocupó un análisis de respuesta Box-Behnken para generar las formulaciones ocupando tres componentes a dos concentraciones diferentes (Quitosano 2-4 %, Grenetina 4-8%, y Glicerol 5-10%) como se muestra en el Cuadro No. 2.
- Para la caracterización se realizó un diseño experimental factorial simple completamente al azar mediante dos tratamientos (T1= películas sin extracto y T2= películas con extracto).

**Cuadro No. 2.** Box-Behnken

<b>NUMERO</b>	<b>QUITOSANO</b>	<b>GLICEROL</b>	<b>GRENETINA</b>
<b>1</b>	4.0	10.0	8.0
<b>2</b>	4.0	5.0	0.0
<b>3</b>	0.0	5.0	0.0
<b>4</b>	2.0	10.0	0.0
<b>5</b>	2.0	5.0	8.0
<b>6</b>	4.0	5.0	16.0
<b>7</b>	2.0	0.0	0.0
<b>8</b>	2.0	0.0	16.0
<b>9</b>	0.0	10.0	8.0
<b>10</b>	0.0	0.0	8.0
<b>11</b>	0.0	5.0	16.0
<b>12</b>	2.0	5.0	8.0
<b>13</b>	2.0	5.0	8.0
<b>14</b>	4.0	0.0	8.0
<b>15</b>	2.0	10.0	16.0

### **5.5 Análisis de vida de anaquel de carne con biopelículas**

- Se realizó un análisis Multifactorial 4 x 5, para lo cual se ocuparon cuatro tratamientos (Testigo: sin biopelícula, T1: película comercial, T2: Biopelícula sin extracto y T3: con biopelícula con extracto) en cinco lapsos de 15 días de vida de anaquel (0, 3, 6, 9 y 15 días).

### **5.6 Materiales**

#### **5.6.1 Residuos Agroindustriales (RA)**

Las hojas arbóreas se recolectaron al azar de varios árboles jóvenes. Se tomaron de las ramas centrales de árboles en producción, durante el verano 2018. Se evitaron las hojas con daño mecánico o biológico. Las especies, guayaba (*Psidium*

*guajava* L.) variedad Calvillo y aguacate (*Persea americana* Mill) variedad Hass se recolectaron de Uruapan, Michoacán (19 ° 250 1600 N, 102 ° 30 4700 W), México, y las de Ciruela cereza (*Prunus cerasifera* Ehrh) variedad Pissardii, fue recolectada en Toluca (19° 170 3200 N, 99 ° 390 1400 W), Estado de México, México. El material vegetativo fue llevado al laboratorio de “Calidad de los Productos Agropecuarios” donde fue desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio 1%. Posteriormente, fueron escurridas y secadas en una estufa de aire forzado a 50 °C, durante 24 h. Las hojas deshidratadas fueron molidas en molino eléctrico marca General Electric, hasta alcanzar un tamaño en partícula menor a 1 mm.

Los extractos de plantas se obtuvieron de acuerdo a lo reportado por Salem *et al.* (2011) con modificaciones. Las extracciones hidroalcohólicas se realizaron con 1 g de hoja seca de las diferentes especies vegetales en 8 ml de la mezcla de disolvente etanol: agua. La mezcla de solventes se hizo con etanol al 20, 50 y 80% (99/100, grado analítico, Fermont <sup>TM</sup>, Monterrey, México). Con agua destilada. Las hojas se maceraron a temperatura ambiente bajo oscuridad 72 h en matraces de color ámbar con tapón de rosca plástica. Luego, se colocaron en baño maría 39 °C 30 min para facilitar su filtrado. Se filtraron con papel filtro Whatman N° 45 y se almacenaron bajo refrigeración 4 °C hasta su uso.

### 5.6.2 Cuantificación de saponinas (SP)

Las saponinas se realizaron por la metodología propuesta por Salem *et al.* 2011 y Makkar *et al.* 1998, en donde primero se realizó una separación de metabolitos secundarios ocupando un embudo de vidrio de separación de fases, por medio de solventes. Para lo cual, se pesaron 10 mL de extracto (hidroalcohólico de cada planta en las diferentes concentraciones) mismos que se vertieron en el embudo con 20 mL de acetato de etilo (99.7 / 100, grado analítico, Fermont®, Monterrey, México) se dejó reposar durante 30 min, para que se realizara la separación de fases (Figura No. 9). La parte contenía a los fenoles, misma que fue eliminada y a la parte restante, se le agregaron 20 mL de n-butanol (99.9 / 100, grado analítico, Fermont®, Monterrey, México), dejando reposar 30 min, dicha solución contiene las saponinas (fase superior de separación) (SP), Finalmente, se evaporó el solvente y el restante fue cuantificado en mg/g de materia seca (MS).



**Figura No. 9.** Separación de saponinas y fenoles en embudo de separación de fases

### **5.6.3 Cuantificación de Fenoles Totales (PT)**

Se realizó una curva patrón de ácido gálico a una concentración de 0.5315 mM con diluciones con agua destilada como se muestra en Cuadro No. 3. La equivalencia de la muestra fue calculada con la siguiente ecuación de la recta ( $Y = 6.8467x + 0.1156$ ) y una  $R^2$  de 0.9921). Obtenida del graficando el (Cuadro No 3).

La equivalencia de fenoles totales fue estimada por el método de Folin-Ciocalteu descrito por (Spizzirri 2009; Arizmendi-Cotero *et al.* 2016). Se tomaron 120  $\mu\text{L}$  de extracto de planta (de las tres especies) que fueron diluidos en 10 mL de agua



destilada. En una celda de 2.5 mL, se mezcló una alícuota de 120  $\mu$ L extracto diluido con 47.5  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y 300  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 15%, y se dejó reposar 15 min. Se Añadieron 1080  $\mu$ L de agua destilada, se mezcló y dejó reposar durante 2 h. Se Midió a 760 nm en un espectrofotómetro. Los equivalentes fenólicos totales se expresaron como equivalentes de ácido gálico por g de materia seca (MS) (Figura No. 10)



**Figura No. 10.** Cuantificación de fenoles totales método Folin-Ciocalteu

**Cuadro No. 3** Curva de patrón de ácido gálico

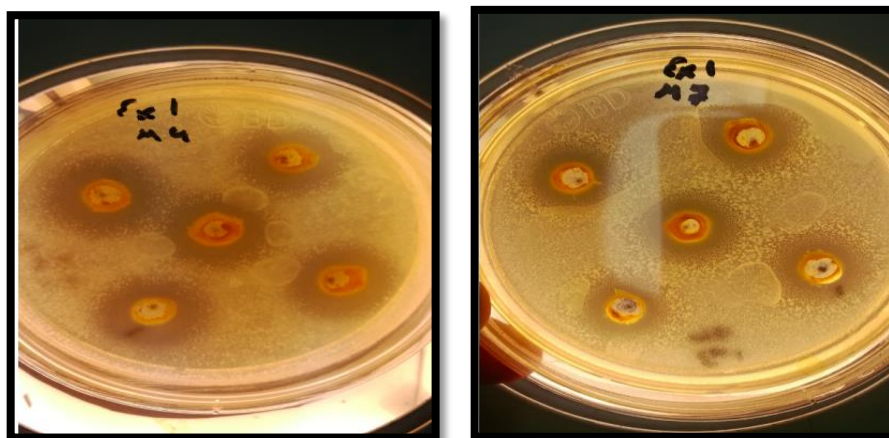
Vial	AG (mg/mL)	M (mmol)	Sol AG ( $\mu$ L)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)
1	0.00	0.0000	0	1000
2	0.01	0.0532	100	900
3	0.02	0.1063	200	800
4	0.03	0.1595	300	700
5	0.04	0.2126	400	600
6	0.05	0.2658	500	500
7	0.06	0.3189	600	400
8	0.07	0.3721	700	300
9	0.08	0.4252	800	200
10	0.09	0.4784	900	100
11	0.1	0.5315	1000	0

#### 5.6.4 Capacidad antioxidante (AC)

La capacidad antioxidante fue cuantificada usando el método ABTS [2.20 -azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido)] reportado por Metha *et al.*, (2014). La formación de radicales libre se realizó mediante una reacción de 7 mM de solución ABTS y 140 mM de persulfato de potasio, que se incubó en oscuridad, 25 °C, 16 h. La solución de radical libre se diluyó en etanol de grado analítico para lograr una lectura de absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 734 nm. Se diluyeron 10 mL de extracto vegetal en 100 ml de etanol. Se tomaron 30 mL de esta solución y se mezclaron con 3 mL de solución de radical ABTS. La absorbancia se midió a 734 nm después de 6 min de reacción, y se generó un patrón de curva Trolox para expresar TEAC mmol/g de MS.

### 5.6.5 Capacidad antimicrobiana por difusión en disco

La actividad antimicrobiana se realizó solo para la extracción 50:50 v/v, de etanol: agua para cada especie de planta, ya que fue la que tuvo la mayor concentración de metabolitos secundarios en los análisis descritos anteriormente. La cual, se midió utilizando el método de difusión en disco por agar, (Figura No. 11), siguiendo la metodología reportada por CLSI, (2012). Se ocuparon 8 cepas microbianas patógenas *Bacillus subtilis* ATCC 662, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomona sp.*, *Klebsiella sp.* y *Salmonella entérica serotipo Enteritidis* ATCC). Dichas cepas se inocularon en Luria Bertani (LB )caldo 18 h, 37 °C. Se realizó una resiembra ocupando 1% de inóculo en caldo LB 2 h, a 37 °C, para alcanzar una concentración microbiana de  $1 \times 10^5$  UFC / mL (cuantificación verificada con recuento en placa). Se inóculo 1 mL del caldo de cultivo con el microorganismo en una caja Petri y se agregó el agar LB, para dejar enfriar hasta solidificar. Se pusieron los discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro con 10  $\mu$ L del extracto hidroalcohólico. Se mantuvieron en refrigeración durante una noche a 4 °C posteriormente, se incubaron a 37 °C 24 h. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. La actividad antimicrobiana se estimó midiendo el diámetro de la zona de inhibición transparente de cada disco de papel de filtro.

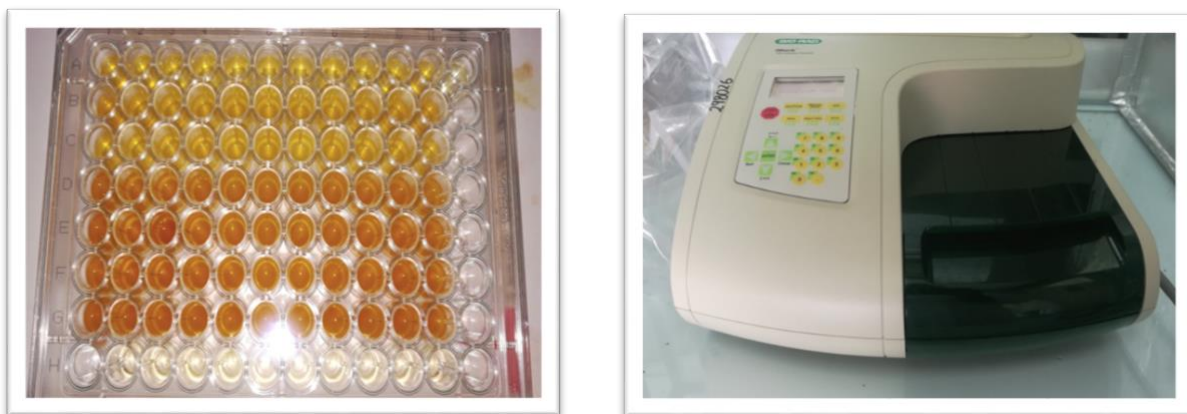


**Figura No. 11.** Capacidad antimicrobiana difusión en disco

#### **5.6.6 Capacidad antimicrobiana mínima inhibitoria (CMI).**

Se realizó el análisis solo para el extracto hidroalcohólico de hoja de guayaba 50:50 v/v, por ser el único con en presentar capacidad antimicrobiana en la prueba anterior. Se utilizó el lector de microplacas (Microplate Reader) (Figura No. 12.) Con el software Microplate 5.0 (BIO-RAD) y el protocolo de cinética de crecimiento de los microorganismos. El extracto hidroalcohólico de hojas de guayaba se analizó a concentraciones de 0,31, 0,62, 1,25, 1,87 y 2,60 mg /mL como solución antimicrobiana. Las siembras se realizaron en microplacas estériles de 96 pocillos de la siguiente manera: Control negativo (50  $\mu$ L de solución antimicrobiana + 150  $\mu$ L de caldo LB), ensayo de prueba (50  $\mu$ L inóculo microbiano + 50  $\mu$ L de solución antimicrobiana + 50  $\mu$ L de caldo LB), control positivo (50  $\mu$ L de inóculo microbiano + 150  $\mu$ L de caldo LB) y blanco de estudio (200  $\mu$ L de caldo LB) para cada determinación (Cuadro No. 4). La absorbancia de las siembras anteriores se midieron a 655 nm a 37 °C cada 30 minutos hasta que los microorganismos

sensibles probados alcanzaron su fase de muerte. Los resultados se expresaron en mg/g de MS y se calcularon según el aumento de fase de adaptación de microorganismos (Andrews 2001).



**Figura No. 12.** Prueba de capacidad antimicrobiana mínima inhibitoria

**Cuadro No. 4.** Identificación de pozos en microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
B	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
C	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
D	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
E	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
F	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
G	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
H	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○



Columna 1: 50  $\mu$ L de solución de antimicrobiano + 150  $\mu$ L de caldo LB  
Blanco de Ensayo.



Columnas 2, 3 y 4: 50  $\mu$ L de solución de antimicrobiano + 50  $\mu$ L de inóculo +  
100 $\mu$ L de Caldo LB Ensayo.



Pozos 5A, 5B y 5C: 50  $\mu$ L de inóculo + 150 $\mu$ L de caldo LB Control Positivo.

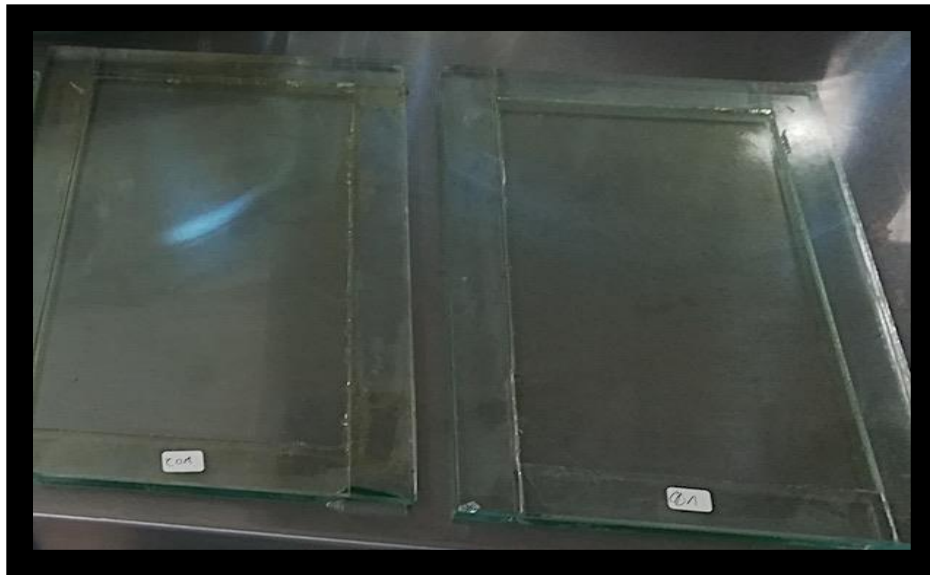


Pozo 5D: 200  $\mu$ L de caldo LB Control Negativo.

### 5.6.7 Elaboración de biopelículas de gelatina-quitosano

Las biopelículas se realizaron por el método de evaporación de solvente (casting), con modificaciones. Se mezclaron 2 g de quitosano con 100 mL de agua a una temperatura de 75 °C en un medio acidificado (para lo cual se adicionó 2 mL de ácido acético puro). Se adicionaron 8 g de grenetina y se agitó 5 min. Se redujo la

temperatura a 30 °C y se adicionó 5 mL de plastificante (glicerol) y 0.6 mL de Tween 80. Se agitó 10 min a dicha temperatura. A las películas bioactivas se les adicionaron 4 mL del extracto con los mejores resultados. La mezcla obtenida fue desgasificada por medio de vacío 1 h, 30 °C. Se adicionaron 20 mL de esta solución en moldes de cristal de 15 x 10 cm como se muestra en la Figura No. 13. Finalmente se dejaron secar en estufa de aire forzado 24 h, a 35 ° C. Al estar secas fueron desmoldadas manualmente.



**Figura No. 13.** Moldes para elaborar biopelículas por método de casting.

## **5.7 Caracterización de las biopelículas**

### **5.7.1 Grosor de las biopelículas**

El espesor de la biopelícula fue medido utilizando un micrómetro digital de mano (Mitutoyo IP 65, Modelo 293-348-30 Mituyoto Corp., Kawasaki-shi, Japón) (Figura

No. 14), con una precisión de 0.00005 a 0.001mm, bajo la técnica descrita por Arfat *et al.*, (2014). Se tomaron 10 mediciones aleatorias de cada muestra y se registró el promedio.



**Figura No. 14.** Micrómetro para medir grosor de películas.

### **5.7.2 Propiedades mecánicas de las biopelículas**

Se midieron la resistencia a la tensión (TS) y Elongación o Módulo de Young (E) de las muestras de ensayo (20 mm x 150 mm) de las películas. Se usó un analizador de textura TA.XT2 plus (Stable Micro Systems, Reino Unido) (Figura No. 15), con una carga de 49.3 N, células equipadas con agarres de tracción (modelo A/TG) mediante el método estándar ASTM D882 02. La separación de agarre se estableció en 30 mm y la velocidad de la cruceta fue de 2 mm/seg. TS y E, fueron evaluados en diez muestras de cada tipo de biopelícula y se registró el promedio.





**Figura No. 15.** Texturómetro

### **5.7.3 Propiedades ópticas de las biopelículas**

### **5.8 Color (L\*, a\* y b\*)**

Se utilizó un colorímetro marca Konica Minolta, Osaka, Japón modelo Chromameter CR-400. Con un iluminante C, D65 y un sistema de iluminación difusa/ángulo de visión 0° mediante el sistema CIE Lab Luminosidad (L\*), Rojos (a\*) y Amarillos (b\*) mediante la técnicas descritas por Wang *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2015. El total de la diferencia de color fue calculado por la siguiente ecuación.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son la diferencia entre los parámetros correspondientes a color de cada muestra y el estándar que, fue el papel de color blanco que se usó como fondo al tomar las mediciones ( $L^*= 93.68$ ,  $a^*=1.93$ ,  $b^*=-1.87$ ).

### **5.8.1 Transparencia (T)**

Fue calculada mediante espectrofotometría siguiendo el método de Wang *et al.*, (2017). La toma de absorbancias se realizó a 600 nm usando un UV-vis espectrofotómetro modelo (G10s uV-vis, Genesys, Madison, USA) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$T = \frac{A_{600}}{M}$$

Donde  $A_{600}$  es la absorbancia a 600 nm y  $M$  es el espesor de la película (mm). Los valores más altos de transparencia representan una mayor transparencia de la película.

### **5.8.2 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)**

Fue determinado mediante la técnica del método gravimétrico de la norma ASTM E96-05 (ASTM, 2005), con el método de agua. Al interior de una copa aluminio de 6 cm de diámetro (Figura No.16) se añadieron 5 mL de agua destilada y se cubrió con la biopelícula. Fueron sometidas 25 °C y humedades relativas de 100–0%. La

pérdida de peso de las copas se midió cada hora durante 9 h. Los resultados fueron expresados en  $(g \text{ mm Pa}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2})$ , ocupando la siguiente fórmula.

$$WVP = \frac{GL}{At\Delta p}$$

Donde G es la diferencia de pesos de la copa (g) durante el ensayo, L es el grosor en  $m^2$ , A es el total del área de la muestra usada en el estudio, t es el tiempo que duró el estudio en s, y  $\Delta p$  es la diferencia de presiones entre el exterior e interior de la copa expresada en Pa.



**Figura No. 16.** Copas de aluminio para medir permeabilidad al vapor de agua

### **5.8.3 Permeabilidad al oxígeno**

Se realizaron las mediciones de la permeabilidad al oxígeno (OP) siguiendo la metodología reportada por Figueroa-López *et al.*, (2018). Se utilizó un analizador de permeabilidad al de oxígeno M8001 (Systech Illinois, Thame, Reino Unido) a 60 % de HR y 23 °C. Donde se colocó una muestra de cada biopelícula de 5 cm<sup>2</sup> en la celda de prueba. Las muestras se purgaron previamente con nitrógeno y fueron equilibradas de humedad antes de la exposición a un flujo de oxígeno de 10 mL/min. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

### **5.8.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

La microestructura de las biopelículas poliméricas se realizó mediante empleando microscopia electrónica de barrido en un equipo (JEOL Modelo 6510LV, Japón), con la metodología de Figueroa-López *et al.*, (2016); Andrade-Mahecha *et al.*, (2012). Se obtuvieron imágenes superficiales de muestras en fragmentos de 4 x 4 mm a una distancia de trabajo de 13 mm, usando las señales de electrones secundarios.

### **5.8.5 Análisis de termogravimetría (TGA) y análisis de Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Los análisis térmicos fueron realizados usando un analizador (SDT Q600 TA instruments, U.S.A) mediante la metodología de Wang *et al.*, (2017); Wang *et al.*,

(2015). Se usó una rampa de temperatura de 25–600 °C, a una velocidad de 10 °C/min, ocupando nitrógeno como gas de purga.

## **5.9 Vida útil de la carne en refrigeración**

### **5.9.1 Análisis microbiológicos y fisicoquímicos**

Se probaron las biopelículas en vida útil de carne en el músculo *Longissimus dorsi lumbar* mismas que se muestran en la (Figura No. 17), procedentes del Rastro Municipal de Toluca.



**Figura No. 17.** Carne del músculo (*Longissimus dorsi lumbar*)

Se usaron muestras de carne de 100 g, mismas que se colocaron en charolas desechables metálicas de aluminio de 10 cm ancho x 15 cm de largo x 5 cm de altura (Figura No. 18). Las cuales se esterilizarón en autoclave para asegurar su inocuidad.



**Figura No. 18.** Charolas desechables metálicas de aluminio.

Las biopelículas fueron comparadas con una película adherente comercial marca Ziploc®

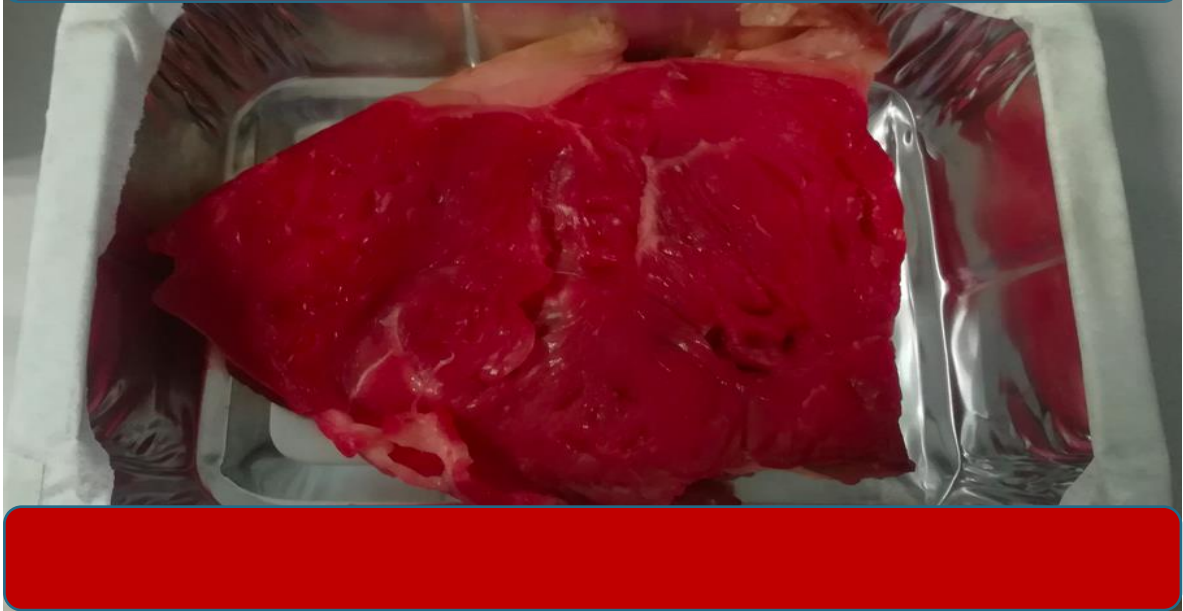


**Figura No. 19.** Película adherente comercial.

Se realizaron análisis microbiológicos (Ma, CT, CF, y Ps) y Físicoquímicos (pH y color) mediante un diseño experimental bifactorial 4x5. El primer factor, fueron los tratamientos Testigo: carne sin película (Figura No. 20), T1: carne con película comercial (Figura No. 21), T2: carne con biopelícula (Figura No. 22), T3: carne con biopelícula activada con extracto de hoja de guayaba (Figura No. 23). El segundo

factor fueron los 5 días (0, 3, 6, 9, 12, 15) en vida de anaquel. Todas las muestras se procesaron por triplicado.

Carne sin película



**Figura No. 20.** Carne sin Película (Testigo).

Carne con película comercial



**Figura No. 21.** Carne con película comercial (T1).

Carne con biopelícula



**Figura No. 22.** Carne con biopelícula (T2).



Carne con biopelícula y extracto de hoja de guayaba



**Figura No. 23.** Carne con biopelícula y extracto de hojas de guayaba (T3).

Para la determinación de los análisis microbiológicos se usó el método destructivo. Las muestras se molieron en una licuadora manual marca Óster, modelo MXC/250-Óster (Figura No. 24). Se filtraron con gasas estériles y se realizaron las diluciones pertinentes conforme a la norma NOM-110-SSA1-1994. Las muestras fueron sembradas por el método de vaciado en placa.



**Figura No. 24.** Método destructivo de carne.

#### **5.9.1.1 Mesófilos Aerobios y Psicrófilos**

Para evaluar la Cuenta Total de Mesófilos Aerobios (MA) y Psicrófilos (PS), se usó la técnica de cuenta en placa, como lo establece la NOM-092-SSA1-1994. Todas las diluciones de las muestras se inocularon por triplicado en agar para cuenta estándar. Para los Mesófilos Aerobios se Incubaron a  $35\pm 2$  °C  $48\pm 1$  h y a 4 °C 7 días para Psicrófilos.

### **5.9.1.2 Coliformes Totales**

La Cuenta Total de Coliformes Totales (CT) se realizó de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994. Todas las muestras se sembraron por duplicado en Agar Rojo Bilis Violeta a  $35\pm 2$  °C durante  $24\pm 1$  h.

### **5.9.1.3 Coliformes Fecales**

Para la Cuenta Total de Coliformes Fecales (CF) se ocupó la norma (AFNOR) NF V08-60 (1996) de la Asociación Francesa, debido a que en México no hay una Norma Oficial referente a la cuenta en placa para éstos microorganismos al considerar que no se consumen en crudo. Se sembraron por triplicado en Agar Bilis y Rojo Violeta a  $45\pm 2$  °C a  $48\pm 1$ h.

### **5.9.1.4 Color**

En la medición del color se utilizó un colorímetro marca Minolta, Osaka, Japón modelo Chromameter CR-400, que utiliza un iluminante C, D65 y un sistema de iluminación difusa/ángulo de visión 0° mediante el sistema CIELAB, Luminosidad ( $L^*$ ), Rojos ( $a^*$ ), Amarillos ( $b^*$ ), Saturación o Cromo ( $C^*$ ) y ángulo de color Hue ( $H^*$ ) siguiendo la técnica descrita por (Ripoll *et al.*, 2011).

### 5.9.1.5 pH

En la evaluación del pH se utilizó un potenciómetro con electrodo de penetración, previamente calibrado marca Thermo Scientific™, modelo Orion Star A215.

Siguiendo la técnica estandarizada por (Honikel, 1998) como se muestra en la Figura No. 25.



**Figura No. 25.** Toma de pH en carne.

## **6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Resultados del análisis multifactorial de la cuantificación de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante**

En el Cuadro No.5, se muestran los resultados de la ANOVA multifactorial  $P \leq 0.05$  para los factores concentración, tipo de residuo agroindustrial y de la interacción. Se puede observar que para el factor concentración e interacción existieron diferencias significativas  $P \leq 0.05$  para las tres variables (TP, SP y AC). Para el factor tipo de residuo agroindustrial solo se encontraron diferencias significativas  $P \leq 0.05$  en la variable TP y en capacidad (AC). Al existir diferencias significativas  $P \leq 0.05$  se realizó una prueba de medias Tukey al 95 % misma que se puede observar en la Cuadro No. 6.

En relación al factor de la relación de solventes, cuando se utilizaron las concentraciones hidroalcohólicas etanol:agua: 20 y 80 v/v, 52.9 mg GAE/g MS (TP), 39.4 mg/g MS (SP) y 204.7 mM TEAC/g MS (AC), 80/20 v/v 56.0 mg GAE/g MS (TP), 48.02 mg/g MS (SP) y 271.8 mM TEAC/g MS (AC) la cuantificación de las variables de todas es menor a que cuando está relación etanol:agua es de 50:50 v/v 89.9 mg GAE/g MS (TP), 105.1 mg/g MS (SP) y 421.9 mM TEAC/g planta seca (AC). Es decir, que cuando la concentración etanol:agua se encuentran en partes iguales 50:50 v/v la extracción de fenoles y saponinas, así como la capacidad antioxidante fue mayor. Esto por los diferentes tipos índice de polaridad los cuales, clasifican al etanol como un solvente de polaridad media y el agua como un solvente

de polaridad alta. Tomando en cuenta que los compuestos químicos de las plantas son atraídos con solventes de las mismas características, la relación agua-etanol 50:50 v/v da una mayor cuantificación de metabolitos secundarios, con dicha polaridad, que se relacionaron con las variables medidas, en comparación a cuando se encuentra la concentración de alguno de los dos solventes en mayor proporción (Masschelein-Kleiner, 2004). Lo cual concuerda con lo reportado por Kiassos *et al.*, (2009) quien también reportó la mayor cantidad de fenoles totales, y capacidad antioxidante con esa misma relación de solventes en cebolla. Aunado a esto, el uso de estos solventes etanol-agua empleados en esta investigación se consideran de baja toxicidad en comparación con solventes no polares como metanol y acetona además de ser considerados un producto más sustentable por su relación de eficacia en extracción de metabolitos secundarios a un bajo costo (Amyrgialaki, 2014).

El cuanto al factor de tipo de residuo agroindustrial las mayores cuantificaciones se observaron en las hojas de guayaba: 86.88 mg GAE/g MS (TP), 69.1 mg/g MS y 332.0 mM TEAC/g MS (AC), en comparación con los otros dos residuos. Los resultados anteriores sugieren la presencia de los diferentes tipos de metabolitos secundarios que se encuentran en la plantas, y que están influenciados por el género familia, o incluso especie, así como por las diferentes condiciones agroclimáticas, estrés o en respuesta a algún peligro que ponga en riesgo la integridad de la planta (Robles-García *et al.* 2016; Domingo y López-Brea 2003).

Algunos autores Díaz-de-Cerio *et al.*, (2016) y Qian y Nihorimbere., (2004), han reportado en hojas de guayaba hasta 72 metabolitos, siendo los principales el ácido gálico, catequina, galocatequina, isómero de procianidina B, morina, ácido elágico, quercetina, glucurónido, reynoutrina y guajaverina . Mismos que presentaron también actividad antioxidante.

**Cuadro No. 5.** Resultados del análisis multifactorial de fenoles totales, determinación saponinas y capacidad antioxidante de los tres residuos agroindustriales

<b>Factor</b>	<b>GI</b>	<b>Fenoles Totales</b>	<b>Saponinas</b>	<b>Capacidad antioxidante</b>
		Suma de Cuadrados		
Concentración	2	7053.16*	13194.0*	445410*
especie	2	7255.64*	503.33	38283.1*
Interacción	4	136.9*	3518.9*	205710*
Total	26	14835	22367.1	766531

Grados de libertad GI, (\*) diferencia significativa.

**Cuadro No. 6.** Cuantificación de fenoles totales, saponinas, capacidad antioxidante ABTS del análisis multifactorial de tres residuos agroindustriales a diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos

<b>Factor</b>	<b>Fenoles Totales mg GAE g<sup>-1</sup> MS</b>	<b>Saponinas mg g<sup>-1</sup> MS</b>	<b>Capacidad Antioxidante mM TEAC g -1 MS</b>
Concentración (etanol / agua)		Medias	
20-80 v/v	52.9 <sub>a</sub>	39.4 <sub>a</sub>	204.7 <sub>a</sub>
50-50 v/v	89.2 <sub>b</sub>	105.1 <sub>c</sub>	421.9 <sub>c</sub>
80-20 v/v	56.0 <sub>a</sub>	48.02 <sub>b</sub>	271.8 <sub>b</sub>
Especie		Medias	
Hojas Aguacate	63.77 <sub>b</sub>	67.47 <sup>a</sup>	299.7 <sub>ab</sub>
Hojas de Ciruela	47.49 <sub>a</sub>	63.1 <sup>a</sup>	266.8 <sub>a</sub>
Hojas de Guayaba	86.88 <sub>c</sub>	69.1 <sub>a</sub>	332.0 <sub>b</sub>

(a, b, c) diferentes letras en las medias significan diferencia significativa.  $P \leq 0.05$

La cuantificación de la interacción en residuos agrícolas. Efecto de la concentración en las variables PT, SP y AC, se muestran en el Cuadro No. 7. En donde, se puede ver que la mejor interacción la presentaron las hojas de guayaba con la concentración de etanol:agua 50:50 v/v 111.7±8.8 mg GAE/g MS (TP), 88.5±6.92 mg/g MS (SP) y 450.3±18 mM TEAC/g MS (AC) en comparación con las otras interacciones. También cabe resaltar que los resultados obtenidos en las tres especies vegetales en esta investigación (52-111 mg GAE g<sup>-1</sup>) se encontraron por encima de lo reportado en otras especies vegetales como ajo, jengibre, comino,



canela y anís (9-45 mg GAE g<sup>-1</sup>). Mismo efecto se encontró en la capacidad antioxidante de guayaba, aguacate y ciruela a diferentes concentraciones (20 %, 50%, 80% etanol) que tuvieron un rango 138-450 mM de TEAC<sup>-1</sup> g en MS por encima de lo reportado en ajo y pimenta 27-43 mM de TEAC g<sup>-1</sup> en MS. Sin embargo, la mayor capacidad antioxidante en esta investigación la tuvo la interacción 50 % etanol-agua en hoja de guayaba (450.3±18 mM de TEAC g<sup>-1</sup>en MS) (Lu *et al.*, 2011; Gorinstein *et al.*, 2008) con lo que se podría considerar como un subproducto con alta capacidad antioxidante.

**Cuadro No. 7** Resultados de la interacción concentración-especie de las variables fenoles totales, saponinas y capacidad antioxidante de tres residuos agroindustriales

Residuos agroindustriales	Concentración (etanol / agua)	Fenoles Totales mg GAE g <sup>-1</sup> MS	Saponinas mg g <sup>-1</sup> MS	ABTS capacidad antioxidante mM TEAC g <sup>-1</sup> MS
Hojas aguacate	20-80 v/v	52.7±0.1 <sup>b</sup>	37.6±5.3 <sup>a</sup>	265.4±57 <sup>c</sup>
	50-50 v/v	82.47±6.2 <sup>d</sup>	113.15±20 <sup>b</sup>	446.7±18 <sup>de</sup>
	80-20 v/v	56.1±1.60 <sup>b</sup>	51.23±6.7 <sup>ab</sup>	187.1±38 <sup>ab</sup>
Hojas ciruela	20-80 v/v	33.61±0.1 <sup>a</sup>	35.85±1.2 <sup>a</sup>	210.8±33 <sup>abc</sup>
	50-50 v/v	73.29±4.8 <sup>c</sup>	113.15±2.5 <sup>b</sup>	368.9±59 <sup>d</sup>
	80-20 v/v	35.5±3.6 <sup>a</sup>	40.33±5.8 <sup>a</sup>	220.6±51 <sup>bc</sup>
Hojas Guayaba	20-80 v/v	72.51±5 <sup>c</sup>	44.65±2.7 <sup>a</sup>	138.0±51 <sup>a</sup>
	50-50 v/v	111.7±8.8 <sup>e</sup>	88.5±6.92 <sup>b</sup>	450.3±18 <sup>e</sup>
	80-20 v/v	76.40±3.7 <sup>cd</sup>	52.55±5.86 <sup>a</sup>	407.8±7 <sup>de</sup>

(a, b, c) diferentes letras en las medias significan diferencia significativa  $P \leq 0.05$ .

## 6.2 Capacidad antimicrobiana de los extractos vegetales por el método de difusión en disco

Se analizaron los resultados de los halos de inhibición en mm de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en disco de agar *in vitro*, que ejercieron los extractos hidroalcohólicos de hojas de las tres especies vegetales en contra de ocho cepas de microorganismos (Cuadro No. 8). Cabe resaltar que solo se ocupó la concentración 50 % etanol ya que presentó los mejores resultados en los análisis previos. Como puede verse en dicho cuadro, el extracto de hoja de guayaba fue el único que presenta actividad antimicrobiana en contra de Bacterias Gram Positivas, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus ps.* y para bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas ps.* y *Klebsiella ps.* ya que los halos de inhibición mostrados fueron mayores a 6 mm que es la medida del disco de papel ocupado. Con lo cual, se comprueba su amplio espectro de inhibición microbiana.

**Cuadro No. 8.** Resultados del análisis antimicrobiano difusión en disco de extractos hidroalcohólicos de tres residuos agroindustriales

Extractos hidroalcohólicos			
Microorganismos	Hojas Guayaba	Hojas Aguacate	Hojas de Ciruela
	Halo en (mm)		
<i>Listeria innocua</i>	15.2±0.45	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	16.8±0.45	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 662	16±0.71	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	15.6±0.55	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	15.6±0.55	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16±0.71	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	17±0.71	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	14.8±0.84	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	14.6±0.55	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i>	15.2±0.45	-	-

Las zonas de inhibición son representadas por diámetro del disco (6mm) más el halo de inhibición del extracto, (-) indica que no existió actividad inhibitoria.

### 6.3 Capacidad mínima inhibitoria MIC y capacidad mínima bactericida MBC

Los resultados de la MIC y MBC se muestran en la Cuadro No. 9. Los análisis se realizaron solo con el extracto hidroalcohólico de 50 % etanol-agua de hoja de guayaba, al ser el único que presentó actividad antimicrobiana en la técnica de difusión en disco (Cuadro No. 4). La MIC fue de 0.62 a 125 mg mL<sup>-1</sup>, en todas las bacterias estudiadas. En relación a la MBC los valores fueron de 1.87 a 2.60 mg mL<sup>-1</sup>. Dentro de los microorganismos que necesitaron una menor concentración de

extracto para ser inhibidos ( $0.62 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se encontraron a *Escherichia coli* 0157; H7. La cuál, es de alta importancia debido al riesgo sanitario que representa en la salud humana y animal. Cabe señalar que se los microorganismos más difíciles de inhibir fueron más las cepas del género de *Salmonella* bajo las condiciones estudiadas.

Las mínimas concentraciones inhibitorias y bactericidas encontradas en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas ps.*, *Klebsiella ps.*, y Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis* encontradas en esta investigación se observaron en un rango de  $0.60$  a  $1.25 \text{ mg mL}^{-1}$  para MIC y de  $1.87$  a  $2.60 \text{ mg mL}^{-1}$  para CMB. Con lo que se observó su amplio espectro de inhibición a dosis bajas. En comparación con otros productos antimicrobianos naturales estudiados por Kittisakulnam *et al.*, (2017) y Baljeet *et al.*, (2015) como fueron el ajo con  $8.8 \text{ mg mL}^{-1}$  y pimienta  $560 \text{ mg mL}^{-1}$ , así como jengibre y comino ( $12.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Así, el resultado encontrado en esta investigación fue menor bajo las condiciones estudiadas. Se sugiere que dicho efecto puede ser explicado por lo reportado por Biswas *et al.*, (2013) que indicó que la capacidad antimicrobiana de los metabolitos genera una ruptura en la pared celular o una interrupción irregular de la matriz intracelular generando con ello, la disminución del crecimiento o muerte del microorganismo.

**CUADRO No. 9.** MIC y MBC de extractos de hojas de guayaba

Microorganismos	Hojas de Guayabas mg mL <sup>-1</sup>	
	CMI	CMB
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	0.62	1.87
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 662	0.62	1.87
<i>Enterococcus faecalis</i> sp.	0.62	1.87
<i>Staphylococcus</i> sp.	1.25	1.87
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.62	1.87
<i>Klebsiella</i> sp.	0.62	1.87
<i>Pseudomonas</i> sp.	0.62	1.87
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1.25	2.60

Capacidad mínima inhibitoria (MIC) y capacidad mínima inhibitoria (MBC)

#### 6.4 Grosor y propiedades mecánicas de las biopelículas

Los resultados de la Cuadro No. 10, indicaron, que ambas biopelículas tuvieron un grosor menor a 0.1 mm y que no mostrando diferencias significativas  $P \leq 0.05$ . Con los valores adecuados conforme lo indica método estándar ASTM D882-02, para poderlas denominar películas plásticas. Por otro lado, los rangos obtenidos para la prueba de resistencia a la tensión mostraron valores entre 24.74 a 27.12 MPa, con una diferencia significativa  $P \leq 0.05$  entra ellos. En donde, la menor resistencia a la tensión la presenta la BCE., tal efecto podría ser explicado por presencia de las micelas del extracto las cuales se encuentran distribuidas por todo el material, como se observó las micrografías en la Figura 3. Dicha distribución afectó la interacción

entre las moléculas de gelatina-quitosano en la red de la película, generando con ello enlaces menos estables y una mayor ruptura en presencia de menor fuerza. En comparación con la literatura, los valores reportados en esta investigación fueron mayores a lo reportado por Wang *et al.*, (2007) quienes obtuvieron un rango entre 3.10 a 15.28 MPa en las películas elaboradas de proteínas o carbohidratos sin mezclar, pero menores a lo reportado por (Wang *et al*, 2017) en una biopelícula de mezcla almidón-gelatina (54.53 a 63.01 MPa).

En cuanto a la elongación o módulo de Young, ambas películas (BSE y BCE) presentaron una elongación cercana al 47 %. En relación a lo que indican otros autores los valores de esta investigación fueron mayores en comparación con lo reportado por Wang *et al* (2017), donde los valores máximos fueron de 10 % en películas de diferentes composiciones de almidón-gelatina, pero menores a lo reportado por Wang *et al.*, (2007) en algunas bases poliméricas sin mezclar, como lo son caseinato de sodio (62-69 %), gelatina (89 %) y almidón de papa (55-71 %) en diferentes concentraciones.

**Cuadro No. 10.** Resultados de las pruebas mecánicas y grosor de las biopelículas.

<b>Biopelícula evaluada</b>	<b>Grosor (mm)</b>	<b>Resistencia a la Tensión (MPa)</b>	<b>Módulo de Young (%)</b>
BCE	0.09±0.01a	24.74±0.68b	47.20±2.70a
BSE	0.08±0.1a	27.12±0.68a	47.37±3.86a

Los valores expresan la media ± desviación estándar. Los valores con letras (a, b) diferentes en superíndice dentro de la misma columna muestran diferencia significativa (P <0.05), biopelícula con extracto (BCE), biopelícula sin extracto (BSE).

## 6.5 Propiedades ópticas de las biopelículas

En el Cuadro 11, se observan los resultados de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $\Delta E$ ), y transparencia. En ambos casos existió diferencia significativa  $P \leq 0.05$  entre BCE y BSE. En donde, el valor de color de las películas BSE fue más cercano al del papel blanco estándar ( $L^* = 93.68$ ,  $a^* = 1.93$ ,  $b^* = -1.87$ ), comparado con los de BCE que fueron ligeramente diferentes. Los valores de  $L^* = 90.7$  de la BSE fueron más luminosos en comparación BCE:  $L^* = 78.8$ . Por otro lado,  $a^*$  y  $b^*$  de la BSE que resultaron menores a las BCE, lo que sugirió que estas últimas presentaron coloraciones ligeras hacia los tonos rojo y azul del círculo cromático. Esto se sugiere debido a la coloración que generan los pigmentos de la planta contenidos en el extracto que resultaron en una coloración café-grisácea, como se muestra en la Figura No. 26 y 27.

**CUADRO No. 11.** Muestra los valores físicos de las biopelículas.

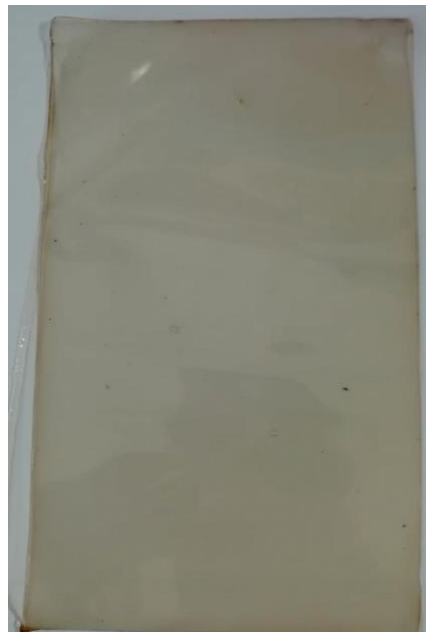
Biopelícula Muestra	Parámetros de color				Valores de Transparencia
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	
BCE	78.8±1.8a	2.4±0.3a	13.8±1.5b	19.1±3.7b	0.79±0.1a
BSE	90.7±0.2b	0.38±0.3b	7.53±1.4a	11.2±3.1a	1.18±0.1b

Los valores expresan la media  $\pm$  desviación estándar. Los valores con letras (a, b) diferentes en superíndice dentro de la misma columna muestran diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), luminosidad ( $L^*$ ), rojos ( $a^*$ ), amarillo ( $b^*$ ), diferencia de color  $\Delta E^*$ , biopelícula con extracto (BCE), biopelícula sin extracto (BSE).

En relación al valor de la transparencia (Cuadro No. 7), que es una cualidad de los cuerpos que deja ver otros objetos a través de ellos, ambas biopelículas Fueron transparentes. Sin embargo, las BSE, presentaron mayor transparencia (1.18) en comparación con los valores de la BCE (0.79). Una biopelícula transparente se sugiere como favorable ya que permite resaltar las características propias del alimento a proteger. Sin embargo, este efecto pudiera afectar las características de color de la carne en la vida de anaquel, al dejar pasar la luz se produce una mayor degradación de mioglobina en la carne, efecto que se sugiere pudiera ser reducido con la ligera coloración que presenta las BCE del presente trabajo.



**Figura No. 26.**  
Biopelículas sin extracto  
(BSE)



**Figura No. 27.** Biopelículas  
con extracto de hoja de  
guayaba (BCE)



## 6.6 Propiedades de permeabilidad de las biopelículas

### 6.7 Permeabilidad al vapor de agua

Los resultados se muestran en el Cuadro No.12, donde se observa que no se encontraron diferencias significativas  $P \leq 0.05$  entre los tratamientos. Lo anterior, concuerda con Giménez *et al.*, (2013), quien elaboró una biopelícula de gelatina adicionada con té verde sin diferencias entre la biopelícula con y sin la adición de extracto. Por otra parte, Figueroa-López *et al.*, (2018), reportó valores de permeabilidad al vapor en una biopelícula de gnetina-celulosa sin extracto de  $4.76 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^2$ , mientras que Avena-Bustillos, (2006), reportó valores de 0.932- 1.884  $\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^2$  de gelatina de mamíferos o de pescado los cuales, presentaron una mayor permeabilidad al vapor de agua que los valores reportado en esta investigación para ambas películas (8.95 a  $9.29 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^2$ ). Por el contrario, Vásconez *et al.* (2009) y Moura *et al.*, (2015), en películas de quitosano, la primera en combinación con almidón de tapioca reportaron  $2.8 \pm 0.3 \times 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^2$ ) y la segunda con quitosano a diferentes pesos moleculares ( $0.62$ -  $1.27 \times 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^2$ ) . Mismas que presentaron una mayor barrera al vapor de agua. Esto puede explicarse ya que el quitosano presenta mayores propiedades de barrera al vapor de agua que la gelatina. Dado que las biopelículas de la presente investigación están realizadas de gelatina-quitosano se sugiere que se combinaron sus propiedades de barrera al vapor de agua y por eso, se obtuvieron valores medios a lo reportado por otros autores. En cuanto a la BCE, no mejoró las propiedades de barrera al vapor de agua en contra posición a lo que reportaron

otros autores, ya que, disminuyen la permeabilidad de las películas al adicionar aceites esenciales de plantas (Martucci *et al.*, 2015; Pelissari *et al.*, 2010).

### 6.8 Permeabilidad al oxígeno de las biopelículas

Los resultados se muestran en el Cuadro No. 12, donde se observó que no existieron diferencias significativas  $P \leq 0.05$  entre los tratamientos. En cuanto a los valores encontrados en esta investigación  $9.7$  a  $9.10 \times 10^{-18} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$  los cuales presentan mayor barrera al oxígeno como a lo reportado por Figueroa-López *et al.*, (2018). En dicho reporte presentó valores de  $(13.8 \pm 1.7 \times 10^{-15} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1})$  en una película de gelatina, igualmente a lo mencionado por Ortega-Toro *et al.*, (2015) en una biopelícula de almidón  $(23 \pm 1.7 \times 10^{-15} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1})$ . Reportada como excelente para envasado de alimentos cárnicos en materia de barrera al oxígeno. Dicho efecto pudo haberse originado a la mejora de las propiedades de barrera al combinar gelatina con quitosano, que cuando se usan por separado.

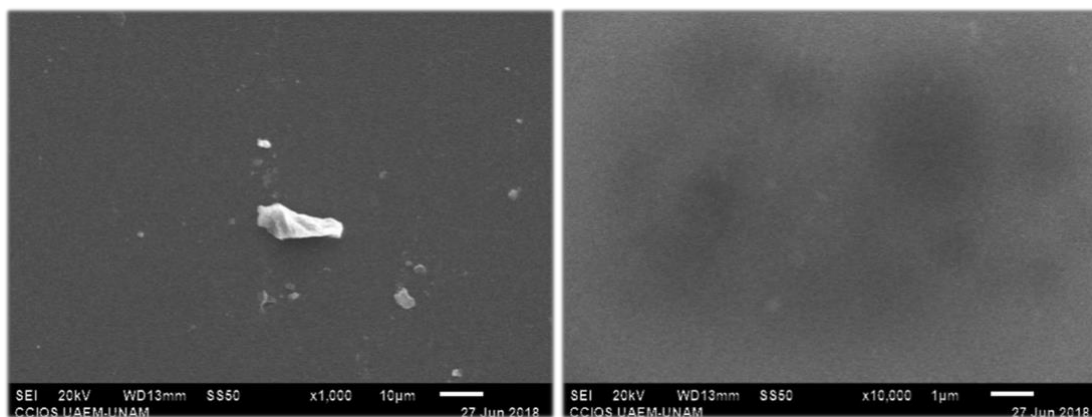
**Cuadro No. 12.** Valores de permeabilidad al oxígeno y al agua

Biopelícula evaluada	Permeabilidad al vapor de agua ( $\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{l}^{-1}$ )	Permeabilidad al oxígeno ( $\text{m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ )
BSE	$9.29 \pm 1.09 \times 10^{-8} \text{ a}$	$9.7 \pm 3.5 \times 10^{-18} \text{ a}$
BCE	$8.95 \pm 1.06 \times 10^{-8} \text{ a}$	$9.10 \pm 0.97 \times 10^{-18} \text{ a}$

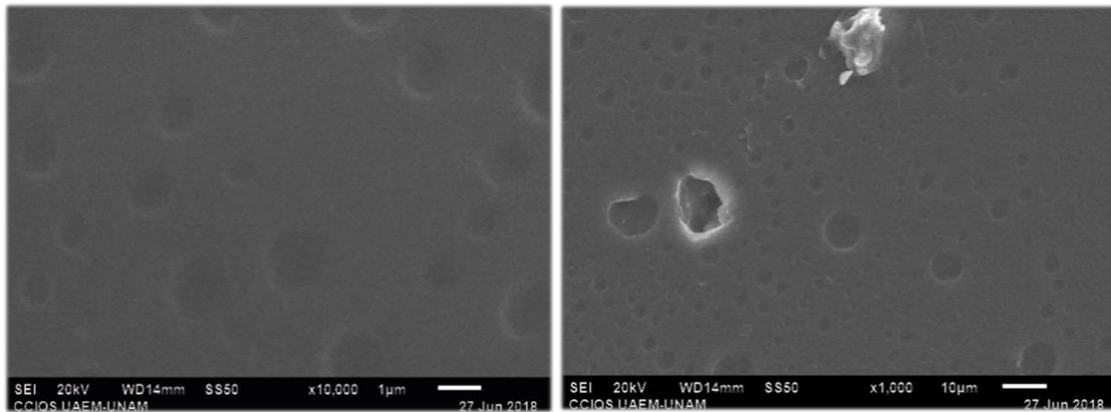
Los valores expresan la media  $\pm$  desviación estándar. Los valores con letras (a, b) diferentes en superíndice dentro de la misma columna muestran diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) biopelícula con extracto (BCE), biopelícula sin extracto (BSE).

## 6.9 Morfología de las películas

La morfología de la superficie de las BCE y BSE derivadas de esta investigación se examinaron por SEM (Figuras No. 28 y 29). En dichas imágenes se observaron superficies lisas con una alta miscibilidad de los materiales excepto por algunas partículas de quitosano. Las cuales, no alcanzaron a solubilizarse, Efecto se sugiere no tubo influencia en la morfología de las películas, al no presentarse porosidad, rugosidad o fracturas en la estructura (Figura No. 29). Las BCE presentaron manchas circulares oscuras conocidas como micelas, que hicieron referencia a fracciones de compuestos hidrofóbicos contenidos en el extracto y que se mostraron distribuidas por toda el área superficial de dicho bioplástico. Estas característica es importante ya que el extracto adicionado, fue quien presentó el efecto antimicrobiano o antioxidante y que puede migrar al material al estar en contacto con el producto a proteger.



**Figura No. 26.** Micrografías de biopelículas sin extracto.



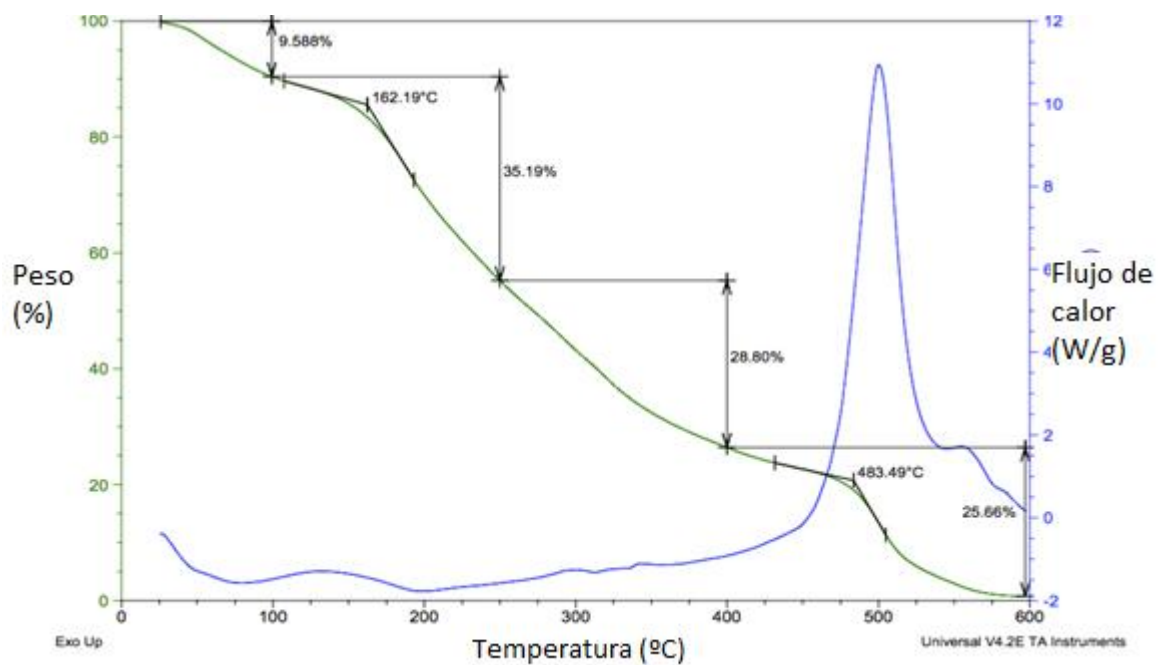
**Figura No. 27.** Micrografías biopelículas con extracto de guayaba.

### **6.10 Termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

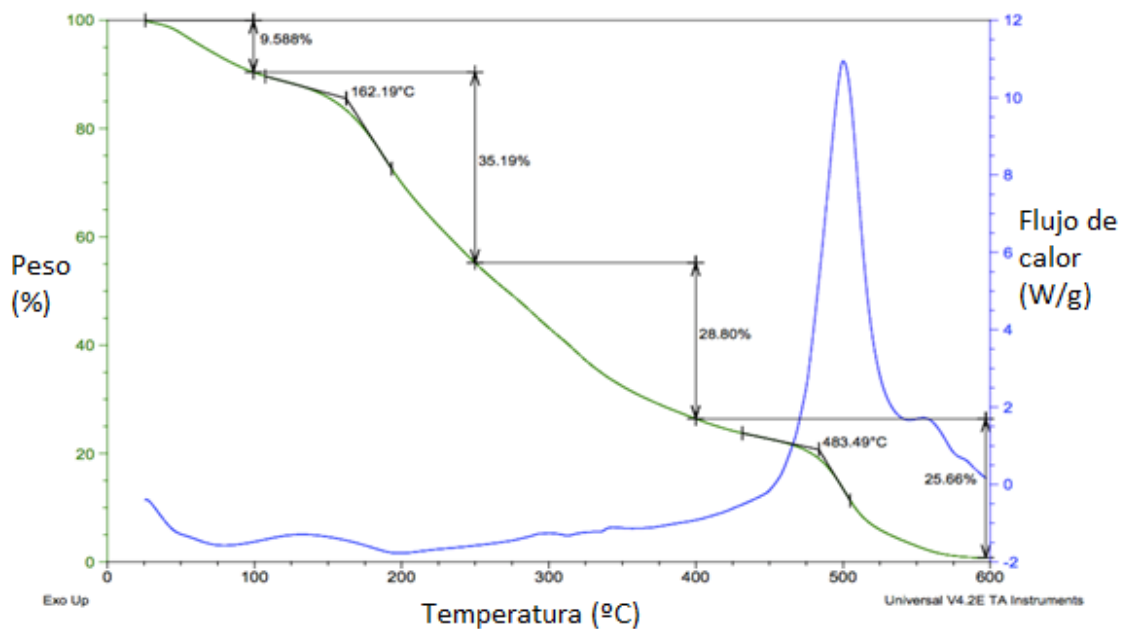
Los resultados de los análisis de TGA se muestran en las Figuras No. 30 (BSE) y Figura No. 31 (BCE), en ambas figuras, de igual forma se mostraron cuatro cambios claros de temperatura y masa. El primer cambio de temperatura, se dio aproximadamente a los 100 °C, con una pérdida de peso de 8.11 % y 9.58 % (BCE y BSE, respectivamente). Lo cuál, sugiere fue relacionado con la pérdida de agua de las muestras. El segundo cambio ocurrió entre los 230 y 250 ° C, registrando una pérdida de peso de 34.10 y 35.19 % (BCE y BSE), donde se sugirió que los valores correspondieron a la pérdida de proteínas de bajo peso molecular constituidas en la gelatina, así como al los componentes del plastificante (glicerol). La tercera etapa se registró alrededor de los 400 °C y mostró una pérdida de peso de 31.15 a 28.80% (BCE y BSE), que se sugirió se debió a la pérdida de carbohidratos presentes en el polímero (quitosano), y por último, en la cuarta etapa alrededor (500-510 °C) se dio la pérdida alrededor del 25 % para ambas películas y se sugirió fue debido a la

degradación de proteínas y carbohidratos de alto peso molecular, así como la fase no volátil del Tween 80.

En cuanto a los resultados de DSC, Hosseini *et al.*, (2016), indicó que el punto de fusión para biopelículas de gelatina es a 29.8 °C y de biopelículas hechas de quitosano de 56.1°C. Tales valores fueron menores en comparación con los resultados encontrados en BSE (75 °C) y que se sugieren que esto ocurrió debido a la interacción, que mejora las características térmicas, al darse una mejor interacción molecular que aumenta la miscibilidad y con ello, se formaron nuevas redes de enlace de hidrógeno. Contrario a esto la BCE no mostró un comportamiento normal de termoplásticos, al no encontrarse diferenciación en la fase de fusión (Figura 6). Por lo observado anteriormente, se sugirió que al adicionarse el extracto hidroalcohólico a las biopelículas, éstas se volvieron termoestables. Posiblemente debido a que los compuestos hidrofóbicos dificultan la interacción entre las moléculas de gelatina-quitosano en la red de la película.



**Figura No. 28.** Micrografía biopelícula sin extracto de guayaba



**Figura No. 29.** Micrografía biopelícula con extracto de guayaba

## **6.11 Resultados vida de útil en carne**

### **6.11.1 Análisis Microbiológicos**

Los resultados para vida útil se analizaron mediante una ANOVA multifactorial al encontrar diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ). Se realizó una prueba de medias Tukey al 95% y los resultados se muestran en los Cuadros 13 y 14.

Como se observa en la Cuadro No. 13, no hay diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos (T1, T2, T3 y T4) en el día 0 para los microorganismos MA (4.06 a 4.25 UFC/ml), CT (3.74 a 3.90 UFC/ml) y PS (2.65 a 3.01 UFC/ml), siendo la carga microbiana igual al inicio del experimento. Debido a que el testigo no cuenta con una película protectora solo se determinó su vida útil hasta el día nueve, ya que presentó daño por frío y se afectaron sus características fisicoquímicas. Contrario a esto, a los T1, T2, y T3 se les determinó el fin de su vida útil al día 15.

### **6.11.2 Mesófilos aerobios**

A los días 3 y 6, se mostró un comportamiento similar presentando una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos. Los resultados en cuanto a cuantificación UFC/mL en los diferentes tratamientos se muestran en el Cuadro No. 13, en donde se indicó que se cuantificaron mayores valores en el testigo y en T1. Lo cual sugirió que la inhibición de Ma fue por efecto de los componentes de las biopelículas, en especial para los T2 y T3 que en su estructura contenía quitosano,

componente que tiene propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Aider, 2010). Aunado a lo anterior el T3 presentó mayor inhibición a estos microorganismos (m.o), como indicaron los resultados, y se sugirió que fue por el componente adicional que es el extracto hidroalcohólico de la hoja de guayaba.

En el día 9, el tratamiento con menor cuantificación volvió a ser T3 en comparación con el testigo. El cual, presentó las mayores proliferaciones en Ma. Cabe mencionar que los T1 y T2, ya no presentaron diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre ellos por lo cual se sugiere que el efecto inhibidor del quitosano alcanzó su mayor inhibición en el lapso de ese tiempo (6 a 9 días).

Los resultados del día 12 presentaron diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos. No obstante, el comportamiento de los mismos fue el esperado, ya que el T3 mostro una menor cuantificación de m.o y que presentó mayores cuantificaciones es el T1. El tratamiento testigo como se indicó anteriormente, a este día presento quemadura por frío (Efecto donde la carne pierde agua y con ello la disminución presencia de microorganismos, por lo tanto ya se no realizaron lecturas posteriores).

Los resultados del día 15 no presentaron diferencias entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ). Sin embargo, en este punto ya las características sensoriales y fisicoquímicas se presentaron como inaceptables para el consumo humano, dando pauta al fin de su vida útil.



### 6.11.3 Coliformes totales y coliformes fecales

En cuanto a los resultados de CF. Éstos microorganismos no se muestran, al no haber presencia de estos microorganismos en la carne en ningún día de la vida de aquel de la carne.

Para los CT los resultados del día tres mostraron un comportamiento muy similar a los mesófilos aerobios como se indicó en el Cuadro No. 13, en donde hubo una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) siendo el T3, el que presentó el mayor efecto antimicrobiano a lo largo de los 15 días de vida útil.

Finalmente cabe resaltar que los T2 y T3, en las variables MA y CT, presentaron un efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ), en cuanto a la cuantificación por días, especialmente interesante al mostrar en el día 3, valores de UFC por debajo de los conteos del día 0 que es la carga inicial del producto. Lo anterior, sugirió que el efecto antimicrobiano y anti fúngico está relacionado por un lado por la presencia de quitosano en la composición de las películas y por otro lado, por la presencia del extracto de hoja de guayaba, siendo las que presentan este último componente la menor proliferación microbiana. Mostrándose dicho efecto solo por un lapso de tiempo, ya que al final de los 15 días evaluados los resultados se mostraron similares entre tratamientos y testigo. Sin embargo, es un efecto benéfico al tomar en cuenta que la carne es un alimento perecedero y su vida ocupación en supermercados es limitada, donde el efecto de la biopelícula con extracto de hoja de guayaba puede mantener la inocuidad del producto por las propiedades

bioactivas antimicrobianas que presenta como se reporta en un trabajo previo (Archundia *et al.*, 2019).

#### **6.11.4 Psicrófilos**

Los resultados se mostraron en el Cuadro No. 13, de manera similar a los microorganismos anteriores. En cuanto a los 15 días de vida útil evaluada en su mayoría, el T3, presento las menores proliferaciones en comparación con el testigo, T1 y T2. Lo cual, sugirió que es el efecto antimicrobiano y antifúngico del extracto de hoja de guayaba mostrado anteriormente.

#### **6.11.5 Análisis físicos**

##### **6.11.5.1 Color (L, a\*, b\*)**

Los resultados de las variables de color L\*, a\*, y b\* se mostraron en el Cuadro No. 14. En cuanto al día del inicio del experimento no se muestran diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Por lo que los tratamientos iniciaron con características iguales en la carne.

En cuanto a la variable de luminosidad (L\*) en los días 3, 6, 9, 12 y 15 de vida útil existieron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), y se formaron dos grupos estadísticamente diferentes. En el primero grupo estuvo el testigo y T1, que fueron a ser más oscuros en comparación con el segundo grupo donde estuvieron T2 y T3. Los cuales, fueron más luminosos. Misma tendencia se observa en la variable

de color ( $a^*$ ), En donde el periodo de vida útil los T2 y T3 mostraron una menor degradación de pigmentos, en comparación con el Testigo y T1. Cabe resaltar que el T3 mostró valores rojos más estables ya que sufrió una menor degradación de sus pigmentos.

En cuanto a la variable de color ( $b^*$ ), en el Cuadro No. 14. Se observó, que para todos los tratamientos del día 0 al 9, no hubo una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Sin embargo, en los días 12 y 15 hubo una notoria diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ), siendo el T3 quien obtuvo mayores valores con tendencia a amarillos. Por el contrario, si se presentara coloraciones con tendencia hacia verde se sugeriría que la carne presentó una mayor putrefacción.

Finalmente, el efecto en la coloración se propuso que pudo haberse debido, por la degradación de mioglobina y oxidación de grasas de la carne que se generó en el testigo (sin película comercial) y el T1 (película comercial) en comparación con T2 (biopelícula gelatina-quitosano) y T3 (biopelícula gelatina-quitosano con extracto) dicho efecto se sugirió que el T2 se da por el quitosano con el que se formaron las películas que presentaron actividad antioxidante (Ngo y Kim, 2014) y lo reportado por Archundia *et al.*, (2019) el cual, indicó una actividad antioxidante en el extracto de guayaba que se ocupó en la elaboración de las biopelículas del T3, lo anterior pudiera explicar la disminución en la oxidación de grasa y mioglobina en la carne por el efecto antioxidante, dando como resultado coloraciones más estables en este tratamiento.

**Cuadro No. 13.** Análisis microbiológicos en vida de anaquel de carne

Día	Tratamientos				P
	Testigo	T1	T2	T3	
<b>Mesófilos aerobios (log<sub>10</sub> UFC/ml)</b>					
0	4.25±0.3aA	4.13±0.1baA	4.17±0.1aB	4.06±0.5aB	0.5125
3	4.62±0.05cB	4.51±0.04cAB	3.59±0.07bA	3.07±0.3aA	0.0001
6	4.64±0.16cB	4.58±0.02cB	4.36±0.13bB	3.87±0.1aB	0.0000
9	5.47±0.24cC	5.20±0.20abB	5.34±0.04bC	5.08±0.12aC	0.0030
12	-	5.58±0.02cD	5.40±0.03bC	5.08±0.04aC	0.0000
15	-	5.31±0.05aC	5.19±0.21aC	5.04±0.27aC	0.1702
<b>p</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
<b>Coliformes totales (log<sub>10</sub> UFC/ml)</b>					
0	3.57±0.13aA	3.90±0.17aA	3.74±0.20abB	3.87±0.15aB	0.5036
3	4.44±0.03cB	3.75±0.21bA	2.73±0.30aA	2.35±0.62aA	0.0004
6	4.84±0.06cC	4.56±0.06bB	4.54±0.05bC	3.6±0.06aB	0.0000
9	5.38±12cD	4.75±0.06bB	4.80±0.02bCD	4.34±0.14aBC	0.0002
12	-	4.69±0.05bB	4.84±0.15bCD	4.67±0.03aC	0.0028
15	-	5.33±0.02bC	5.02±0.04abD	4.77±0.07aC	0.0000
<b>P</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
<b>Psicrófilos (log<sub>10</sub> UFC/ml)</b>					
0	3.01±0.7aA	2.65±0.52aA	2.65±0.52aA	2.69±0.32aA	0.8192
3	5.30±0.17bB	5.57±0.38cB	5.42±0.03bcB	4.90±0.23aB	0.0297
6	5.59±0.06aBC	5.88±0.02bB	5.9±0.02bC	5.69±0.09aAB	0.0005
9	5.97±0.12aABC	6.63±0.10cCD	6.5±0.12cC	6.3±0.02bCD	0.0004
12	-	7.17±0.02bCD	7.3±0.09bD	6.9±0.01aDE	0.0000
15	-	7.82±0.15bD	8.1±0.18bE	7.39±0.01aE	0.0000
<b>P</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	

Letras minúsculas (abcd) muestran diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre filas, letras mayúsculas (ABC) muestran diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre columnas, unidades formadoras de colonia (UFC), Película comercial (T1), Biopelícula gelatina-qitosano (T2), Biopelícula gelatina-qitosano con extracto de hoja de guayaba (T3).

**Cuadro No. 14.** Análisis de color en vida de anaquel de carne

Día	Tratamientos				P
	Testigo	T1	T2	T3	
<b>Luminosidad (L*)</b>					
0	40.22±1.95aD	40.13±0.60aC	39.53±0.64aE	38.64±0.62aD	0.3457
3	34.11±0.59aC	39.58±1.45bBC	32.23±1.49aD	36.28±1.29bD	0.0028
6	26.53±0.74aB	35.54±2.41dB	27.91±0.22bC	31.26±0.73cC	0.0003
9	22.70±0.78aA	29.44±0.57cA	25.83±0.88bB	31.20±0.56cBC	0.0000
12	-	29.07±0.60bA	24.72±0.4aB	30.04±0.68bB	0.0000
15	-	28.84±0.40bA	22.89±0.34aA	27.77±1.01bA	0.0000
<b>P</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0318	
<b>Rojos (a*)</b>					
0	26.07±2.47aC	23.50±0.51aF	24.46±0.7abF	25.7±0.53bcD	0.4508
3	20.98±2.26aB	19.27±1.01aE	21.61±0.24aE	21.11±1.66aC	0.0525
6	13.46±1.12aA	15.51±1.17abD	16.89±0.63bD	20.02±0.8cC	0.0001
9	12.58±1.65aA	12.27±0.75aC	15.26±0.54bC	16.86±0.81cB	0.0134
12	-	6.01±1.64aB	14.13±0.07bB	14.85±0.08cA	0.0001
15	-	3.36±0.47aA	8.90±1.37bA	14.05±0.7cA	0.0000
<b>P</b>	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	
<b>Amarillos (b*)</b>					
0	20.20±0.17aC	19.21±1.51aE	17.52±0.33aE	19.42±2.34aC	0.2045
3	19.93±2.64aB	17.28±1.16aE	16.51±1.75aE	18.15±0.24aC	0.1502
6	12.58±2.03 <sup>a</sup> A	15.04±0.60aD	11.86±1.11aC	13.65±1.47aB	0.1012
9	11.37±1.36aA	11.8±0.67aC	11.50±0.07aC	11.63±2.21aAB	0.9280
12	-	9.89±0.64aB	9.22±0.63aB	10.8±0.4cA	0.0318
15	-	7.53±0.49aA	7.78±1.1aA	9.98±0.69bA	0.0303
<b>P</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	

Letras minúsculas (abcd) muestran diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre filas, letras mayúsculas (ABCDEF) muestran diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre columnas), Película comercial (T1), Biopelícula gelatina-quitosano (T2) y Biopelícula gelatina-quitosano con extracto de hoja de guayaba (T3).

## 7 CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación mostraron que la mayor extracción de metabolitos secundarios (fenoles totales, saponinas), para las especies estudiadas se dio con la concentración hidroalcohólicas etanol-agua de 50-50 v/v. Por otra parte la especie vegetal que presentó la mayor capacidad antioxidante ABTS y la única que presenta inhibición microbiana en contra de las 8 bacterias enteropatógenas estudiadas fueron los de las hojas de guayaba. Posteriormente, en el desarrollo de biopelículas, el análisis de Box-Behnken sugiere que la mejor combinación para su elaboración fue con una relación de 2% quitosano, 8% grenetina y 5% de plastificante. En cuanto a la caracterización de la biopelícula gelatina-quitosano con y sin extracto de hojas de guayaba, ambas presentaron buenas propiedades plásticas. En cuanto al efecto que causó la adición del extracto se observó que no hubo efecto sobre las propiedades de grosor, elongación, módulo de Young, permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, así como en la morfología, ni sus propiedades térmicas como TGA y DSC. En contraparte a esto, la adición del extracto si mostró diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en resistencia a la tensión, donde se observó una disminución en este valor, así como un efecto visible en las imágenes SEM de la presencia y distribución homogénea de las micelas del extracto y las cuales, pudieran otorgar a las biopelículas un efecto benéfico bioactivo en la vida útil de carne bovina manteniendo la inocuidad y características fisicoquímica de la carne por un lapso mayor de tiempo.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Aaslyng M, Kerry J, Ledward D. (2002). Meat processing: improving quality. Woodhead Publishing Ltd Quality indicators for raw meat; pp. 157–174.
- Acosta SD. (2014) Tesis Doctoral. Tema: propiedades de films de almidón de yuca y gelatina. Incorporación de aceites esenciales con efecto antifungico. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- AFNOR, 1996. Microbiology of food and animal feedings stuffs. Enumeration of thermotolerant coliforms by colony-count technique at 44°C, routine method. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- Ahmad, M., Hani, N. M., Nirmal, N. P., Fazial, F. F., Mohtar, N. F., & Romli, S. R. (2015). Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. *Progress in Organic Coatings*, 84, 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.02.016>
- Aider, Mohammed. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Food Science and Technology* 43 (2010) 837–842
- Amyrgialaki, E., Makris, D.P., Mauromoustakos, A., Kefalas, P. (2014). Optimization of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 59:216-222, doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.011.
- Andrade-Mahecha, M. M., D.R. Tapia-Blácido., & F.C. Menegalli. 2012. Development and optimization of biodegradable film based on achira flour. *Carbohydr. Polym.* 88(2), 449-458. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.12.024.
- Andrews JM. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48(suppl. S1) 5–16.
- Arfat, Y. A., Ahmed, J., Hiremath, N., Auras, R., & Joseph, A. (2017). Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 62, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.009>
- Arizmendi-Cotero, D., Gómez-Espinosa, R. M., Dublán García, O., Gómez-Vidales, V., & Domínguez-Lopez, A. (2016). Electron paramagnetic resonance study of hydrogen peroxide/ascorbic acid ratio as initiator redox pair in the inulin-gallic acid molecular grafting reaction. *Carbohydrate Polymers*, 136, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.037>.
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. C., & Jiménez, A. (2011). Envases alimentarios sostenibles. *Seguridad y Medio Ambiente*, 31(121), 46–56. Retrieved from <http://www.mapfre.com/fundacion/html/revistas/seguridad/n121/docs/Articulo4.pdf>

- ASTM. Designation D 882-02: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In Annual Book of ASTM Standards; American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA, USA, 2002.
- ASTM. Designation E 96-05: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. In Annual Book of ASTM Standards; American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA, USA, 2005.
- Ávalos-García A y Pérez-Urria EC. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145, 2009 SSN: 1989-3620 .
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161–172. <https://doi.org/10.4067/s0718-04622006000200010>
- Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Olson, D. A., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., & McHugh, T. H. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71(4), 202–207. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00016.x>
- Balart-Gimeno R., López-Martínez J., García-Sanoguera D., & Parres-García F. (2003). Técnicas experimentales de análisis térmico de polímeros. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Balian, G., & Bowes, J.H. (1977). The structure and properties of collagen. In: Ward AG, Courts A, editors. The science and technology of gelatin. London: Academic Press. 1–31.
- Baljeet, S. Y., Simmy, G., Ritika, Y., & Roshanlal, Y. (2015). Antimicrobial activity of individual and combined extracts of selected spices against some pathogenic and food spoilage microorganisms. *International Food Research Journal*, 22(6), 2594–2600.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barreto M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). Salmonella entérica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile, *Rev Chilena Infectol*; 33 (5): 547-557.
- Begum, S., Hassan, S. I., & Ali, S. N. (2004). Chemical Constituents of the Leaves of *Psidium guajava*. *Natural Product Research*. 18(2) 37–41. <https://doi.org/10.1080/14786410310001608019>
- Binnie, M. A., Barlow, K., Johnson, V., & Harrison, C. (2014). Red meats: Time for a paradigm shift in dietary advice. *Meat Science*, 98(3), 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.024>.
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., & Yadav, A. (2013). Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/746165>
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: Characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.



- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>
- Carrasco R. y Lozano J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud, *Enf Inf Microbiol* 37 (3): 95-104.
- Cazón, P., Velázquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- Chen, F. F., Sang, J., Zhang, Y., & Sang, J. (2018). Development of a green two-dimensional HPLC-DAD/ESI-MS method for the determination of anthocyanins from *Prunus cerasifera* var. *atropurpurea* leaf and improvement of their stability in energy drinks. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 1494–1502. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13730>
- Cho, S.M., Kwak, K.S., Park, D.C., Gu, Y.S., Ji, C.I., Jang, D.H., & Lee, Y.B., et al. (2005). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Journal of Food Hydrocolloids* 18(4): 573–579.
- CLSI (Institute of Clinical Standards and Laboratory). 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition 32 (1) 1-58.
- Codex Alimentarius. (2005). Código De Prácticas De Higiene Para La Carne. 1–55.
- Coltelli, M. B., Wild, F., Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lindner, M., Schmid, M., & Lazzeri, A. (2016). State of the art in the development and properties of protein-based films and coatings and their applicability to cellulose based products: An extensive review. *Coatings*, 6(1), 1–59. <https://doi.org/10.3390/coatings6010001>
- Cosgrove, M., Flynn, A., & Kiely, M. (2004). Impact of disaggregation of composite Foods on estimates of intakes of meat and meat products in Irish adults. *Public Health Nutrition*, 8(3), 327–337.
- Crapo, C., Bechtel, P. (2003). Utilization of Alaska’s seafood processing byproducts. In: Bechtel PJ, editor. *Advances in seafood byproducts*. 2002 Conference Proceedings. Fairbanks: Alaska Sea Grant College Program, Univ. of AK. 105–19.
- Dangaran, K., Tomasula, P. M., & Qi, P. (2009). Edible Films and Coatings for Food Applications. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*. 25-56 pp. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1>
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.002>
- Díaz-de-Cerio, E., Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2016). Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *Journal of Functional Foods*, 22, 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.040>

- Domingo D., & López-Brea M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap* Vol.16 4: 385-393.
- Domínguez, M., & Jimenez, M. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 110–121.
- Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., & Degirmencioglu, A. (2011). The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat Science*, 88(2), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.021>
- FAO. (2002). Sistema de Calidad e Inocuidad de los Alimentos - Manual de capacitación sobre la higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control. ISBN 92-5-304115-3. [http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits\\_es/others/docs/sistema\\_pd\\_\(2013\).](http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/sistema_pd_(2013).)
- Fennema, O. (2002). Química de los Alimentos. 2da ed. España: acribia
- Fernández, V. D., Silvia, B. B., Fernández, V.D., Ocampo, R.A., García, P.A. & Falcón, R.A. (2013). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 24(3): 52-57
- Figueroa-López, K. J., Castro-Mayorga, J. L., Andrade-Mahecha, M. M., Cabedo, L. & Lagaron, J. M. (2018). Antibacterial and barrier properties of gelatin coated by electrospun polycaprolactone ultrathin fibers containing black pepper oleoresin of interest in active food biopackaging applications. *Nanomaterials*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/nano8040199>
- FIRA, 2017. Carne de bovino, Panorama agroalimentario. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial 1-26 pp.
- García E., Fernández S.I., & Fuentes A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, España.
- García-Díaz, G. y Macías-Matos, C. (2008). Temas de Higiene de los alimentos.
- Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M.E., & Montero P. (2013). Release of active compounds from agar and agargelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 30 (2013) 264-271. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.014>
- Glitsh, K. (2000). Consumer perceptions of fresh meat quality: Cross-national comparison. *British Food Journal*, 102, 177–194
- Gómez-Flores, R., Arzate-Quintana, C., Quintanilla-Licea, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., Monreal-Cuevas, E., & Rodríguez-Padilla, C. (2008). Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae)(Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. *American- Eurasian Journal of Scientific Research* 3(2), 188-194.
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>

- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- Gonçalves, F. A., Andrade Neto, M., Bezerra, J. N. S., Macrae, A., De Sousa, O. V., Fonteles-Filho, A. A., & Vieira, R. H. S. D. F. (2008). Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 50(1), 11–15. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000100003>
- González, H., Mesa, G., & Quintero, C.. (2014). Estimación de la vida útil de almacenamiento de carne de res y de cerdo con diferente contenido graso. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* ISSN 0121-4004 / ISSN 2145-2660 21(3) 201-2010.
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewiecki, J., & Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4418–4426. <https://doi.org/10.1021/jf800038h>
- Guija-poma, E., Inocente-Camones, M.Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15(1), 57–60.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK, p 704. 2.
- Heredia, N., Dávila Aviña, J., Solís Soto, L., & García, S. (2014). Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. *Nacameh*, 8(1), 20–42.
- Hernández, I. (2004). La quitinaun producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 97–110
- Honikel, K.O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*. 49 (4). pp. 447-457.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2016). Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 194, 1266–1274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.004>
- IICA, (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) Caracterización del valor nutricional de alimentos. PROCISUR 1-210.
- Iphorski, M., & Bozzano B, P. (2013). Microscopía Electrónica de Barrido en la Caracterización de Materiales. *Ciencia e Investigación*. 63 (3) 2013 43-53. <https://doi.org/10.1093/nq/s10-IV.96.358-a>
- Irchhaiya, R., Kumar, A., Yadav, A., Gupta, N., Kumar, S., Gupta, N., & Gurjar, H. (2015). Metabolites in Plants and Its Classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 287–305.

- Jemmi, T., & Stephan, R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. 25(2), 571-580
- Joo, S. T., Kim, G. D., Hwang, Y. H., & Ryu, Y. C. (2013). Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Science*, 95(4), 828–836. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.044>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962. <https://doi.org/10.1021/jf990146l>
- Karabagias, I., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*, 88(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.010>
- Kaur, S., & Dhillon, G. S. (2014). The versatile biopolymer chitosan: Potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(2), 155–175. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770385>
- Kiassos, E., Mylonaki, S., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2009). Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.10.004>
- Kittisakulnam, S., Saetae, D., & Suntornsuk, W. (2017). Antioxidant and Antibacterial Activities of Spices Traditionally Used in Fermented Meat Products. *Journal of Food*
- Konigsberg, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo, Aplicaciones Médicas. *Ed. Manual Moderno*, p 368 .
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000400016>
- Lárez, V. C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15–21.
- Lee, S. H., Joo, S. T., & Ryu, Y. C. (2010). Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. *Meat Science* 86 (3) 166–170
- López Hernández, L. H., Braña Varela, D., & Hernández, Isabel. (2013). *Estimación de la Vida de Anaquel de la Carne*.
- López, A.M. (2013) .Diseño, desarrollo y aplicación de envases comestibles potencialmente bioactivos, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid España.
- Lu, M., Yuan, B., Zeng, M., & Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*, 44(2), 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.055>

- Mad-Ali, S., Benjakul, S., Prodpran, T., & Maqsood, S. (2017). Characteristics and Gel Properties of Gelatin from Goat Skin as Affected by Extraction Conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), 845–854. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12949>
- Majid, I., Nayik, A.G., Dar, M.S., Nanda, V. (2016). Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi of agricultural Sciences*. 1-9 pp. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.003>
- Makkar, H. P. S., Sen, S., Blümmel, M., & Becker, K. (1998). Effects of Fractions Containing Saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculiformis* on Rumen Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4324–4328. <https://doi.org/10.1021/jf980269q>
- Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100–121. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003>
- Mariod, A. A., & Fadul, H. (2015). Extraction and characterization of gelatin from two edible Sudanese insects and its applications in ice cream making. *Food Science and Technology International*, 21(5), 380–391. <https://doi.org/10.1177/1082013214541137>
- Martínez-Tenorio. y López-Malo, V.A. (2011) Envases Activos con agentes antimicrobianos y sus aplicaciones en los alimentos, *Temas Selectos de ingeniería de alimentos*. 5 (2) 1-12.
- Martínez, M., Molina, N., & Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium Gujava* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1), 12–14.
- Martino-Zagovalov, T.M., Leyva-Catillo, V., Puig-peña, Y. (2008). Temas de Higiene de los alimentos. In A. Caballero (Ed.), principales bacterias patógenas en alimentos. (Vol. Capítulo 3, pp. 29). *Ciencias médicas La Habana* (Cuba).
- Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M., & Ruseckaite, R. A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.079>
- Masschelein-Kleiner, L. (2004). Los solventes. In *Santiago* (Vol. 1). Retrieved from. [https://8498725384723578416-a-1802744773732722657-s-sites.googlegroups.com/site/evachicorestauracion/Los disolventes.pdf](https://8498725384723578416-a-1802744773732722657-s-sites.googlegroups.com/site/evachicorestauracion/Los%20disolventes.pdf)
- McAfee, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W., Wallace, J. M. W., Bonham, M. P., & Fearon, A. M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.029>
- Mehta, S., Soni, N., Satpathy, G., & Gupta, R.K. (2014). Evaluation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of exotic fruit " *Limonia acidissima* ". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 3(32), 81–8881.
- Mercado-Mercado, G., Carrillo, L. de la R., Wall-Medrano, A., Díaz, J. A. L., & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutricion Hospitalaria*, 28(1), 36–46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>

- Miranda, S.P., Garnica, O., Lara-Sagahon, V. and Cárdenas, G. (2004). Water Vapor Permeability and Mechanical Properties of Chitosan Composites Films. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 49(2):173-178.
- Moura, J. M., Farias, B. S., Rodrigues, D. A. S., Moura, C. M., Dotto, G. L., & Pinto, L. A. A. (2015). Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 470–477. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0730-y>
- Mussel, D. (1983). *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia, España.
- Musso, Y.S. (2017). Tesis Doctorado. Desarrollo de películas proteicas para el envasado activo e inteligente de alimentos. Universidad Nacional de la plata. Argentina
- Nerín de la puerta, C. (Ed.). (2009). Seguridad alimentaria en materiales en contacto con los alimentos. En: Seguridad alimentaria e higiene de los alimentos (pp. 127-146). Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud.
- NF V08-060. Microbiology of food and animal feedings stuffs. Enumeration of thermotolerant coliforms by colony-count technique at 44 °C. Routine Method. Association Française de Normalisation (AFNOR); 1996.
- Ngo ,D. H. and Kim, S. K. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review, *Food Science and Technology* 43 837–842
- Niehues, E., & Quadri, M. G. N. (2017). Spinnability, morphology and mechanical properties of gelatins with different bloom index. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(1), 253–261. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170341s20150418>
- NOM-092-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. NOM-092-SSA1-1994. SSA. México, D.F., Diario Oficial de la Federación. 8 pp.
- NOM-110-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Diario Oficial de la Federación, México D.F., México.
- NOM-113-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios, Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación, México D.F., México.
- Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2014). Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.015>
- Nychas, G.J.E., Marshall, D.L., & Sofos, J.N., (2007). Meat, Poultry and Seafood. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* 3ra. Edición. Washington, Estados Unidos, Ed. Doyle and Beuchat, ASM press, 2007, p. 105-140.

- Ojewole, J.A. y Amabeoku, G.J. (2006). Anticonvulsant Effect of *Persea americana* Mill(Lauraceae) (Avocado) Leaf Aqueous of Mice. *Phytother. Res* 20,696–700.
- Onega, M. E. (2003). Tesis Doctorado. Evaluación de la calidad de carnes frescas: aplicación de técnicas analíticas, instrumentales y sensoriales.. Universidad Complutense de Madrid. Madrid España.
- Ordoñez, G.E, León, A.A., Reátegui, D.D., & Sandoval, C.M. (2011) Cuantificación de Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante en Hojas, Corteza, Flores y Fruto de dos Variedades de Guayaba (*Psidium guajava* L.) *Investigación y Amazonía* 1(2): 48- 52.
- Ortega-Toro, R., Contreras, J., Talens, P., & Chiralt., A. (2015). Physical and structural properties and thermal behaviour of starch-poly( $\epsilon$ -caprolactone) blend films for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 5, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.04.001>
- Pal, M., & Devrani, M. (2018). Application of Various Techniques for Meat Preservation. *Journal of Experimental Food Chemistry*, 04(01), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2472-0542.1000134>
- Palacios- Gordillo, L.G. (2008). Desarrollo y caracterización de películas activas de matriz quitosano con derivados del ácido hidroxicinámico, Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pined, E. A. G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7499–7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>
- Pereda, M., Moreira, M., Roura, S., Marcovich, N., & Aranguren, M. (2014). Bio-películas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos. *Ciencia e Investigación*. 64 (2) 35-50.
- Pereira, P. M. de C. C., & Vicente, A. F. dos R. B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- Perez, E. C. K. (20012). Empaques y Embalajes, Red tercer milenio, primera edicion. 5-105
- Pineda-Velázquez, A.A. (2014). Tesis de Maestría. Películas de Zeina Activadas Con Ácido Trans-Cinámico y Derivados del Ácido Hidroxicinámico. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Qian, H., & Nihorimbere, V. (2004). Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J Zhejiang Univ SCI* (5):676–683.ISSN 1009-3095.
- Quintanar, M. A., & Salinas Calderón, J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89–101. Retrieved from. <http://www.redalyc.org/pdf/490/49016098004.pdf>
- Quintero, C.J., Falguera, V., & Aldemar, M.H. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola *Revista Tumbaga* 2010 (5) 93-118.

- Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A., & Garrigós, M. C. (2016). Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications, *Coatings*, 6, 41, <https://doi.org/10.3390/coatings6040041>
- Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Parisi, O.I., Cirillo, G., Curcio, M., Lemma, F., & Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425-1435. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.04.028.
- Ripoll, G., Joy, M., & Muñoz, F. (2011). Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. *Meat Science*, 542 87, 88–93. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.09.008>.
- Robles-García, M., Aguilar Antonio, J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Felix, F., Morales-del-Río, A., Guerrero-Medina, P., & Del-Toro-Sánchez, C. (2016). Identificación Cualitativa de Metabolitos Secundarios y Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de Tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Biocercia*, 3, 3–8.
- Rodríguez-Ángeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de Mexico*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., Andrade, M. J., Kylli, P., & Estevez, M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5625–5635. <https://doi.org/10.1021/jf1048832>
- Rodríguez-Sauceda, R., Rojo-Martínez, G.E., Martínez-Ruiz, R., Piña-Ruiz, HH., Ramírez-Valverde, B., Vaquera-Huerta, H., & Cong-Hermida, M.C. (2014). Envases Inteligentes para la Conservación de Alimentos, *Ra Ximhai*, 10 (6) 151 -173.
- Rodríguez, E., Arias, A., Vasquez, E., Martínez, J., & Stashenko, E. (2012). Rendimiento Y Capacidad Antioxidante De Extractos De *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis* y *Psidium Guajava* Obtenidos Con Co2 Supercrítico. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 36(140), 305–316.
- Rodríguez, S. y Nereida, E. (2011). Uso de Agentes Antimicrobianos Naturales en la Conservación de Frutas y Hortalizas. *Revista Ra Ximhai* 7 (1) 153-170.
- Salem, A. Z. M., Olivares, M., Lopez, S., Gonzalez-Ronquillo, M., Rojo, R., Camacho, L. M., ... Mejia, H. P. (2011). Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 170(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.08.002>
- Sánchez, G. E. (2012). Tesis Doctorado. Efecto de Compuestos Fitoquímicos Sobre Microorganismos de Importancia en Alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. México.
- Sauceda, R., Nereyda, E. (2011). Uso de Agentes Antimicrobianos Naturales en la Conservación de Frutas y Hortalizas , *Ra Ximhai* , (7), 1152-170 pp.



- Serna-Cock, L.; Pineda-Cuervo, D., & Ayala-Aponte, D. (2007). Application of alkaline endopeptidase in bovine hide to improve the quality of the gelatine. *Revista Colombiana de Química*, 36(2), 169–181. Retrieved from. <http://bdigital.unal.edu.co/13380/1/876-5926-1-PB.pdf>
- SIAP, 2019, página visitada el jueves 23 de mayo del 2019. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Rosa, M. D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 634e643. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>.
- Souza, P.L., Damé, L.F., Hörnke, G., Ziemann, A., Alves, M.R., & Araujo M,C. (2011). Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16(4) 324-330.
- Spizzirri, U. G., Lemma, F., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O. I., & Picci, N. (2009). Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin. *Biomacromolecules*, 10(7), 1923–1930. <https://doi.org/10.1021/bm900325t>
- Suhagia, B., Rathod, I., & Sindhu, S.(2011). *Sapindus mukorossi* (Areetha): an overview. *IJPSR*. (8):1905-913.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- Tiwari, R., & Rana, C.S. (2015). Plant secondary metabolites: a review *International Journal of Engineering Research and General Science* (3) 660-670, ISSN 2091-2730.
- Torres, R. F. J., Murgado, A. E. M., Vega, Z. M., & Gutiérrez, S. M. (2010). Efectos del Envase en la Percepción de Calidad de los Aceites de Oliva en un Contexto de Prueba. *Revista de Estudios Empresariales* 1(1): 129-143
- Valdés, L., Tamargo, B., Salas, E., Plaza, Enrique, I. L., Blanco, Y., Otero, A., & Sierra, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L . ( jaboncillo ) Determination of saponins and others secondary metabolites in aqueous extracts of *Sapindus saponaria* L . ( jaboncillo ). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 106–116.
- Valencia, E.F., Mac Donald, D., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2005). Extracción, Identificación y Evaluación de Saponinas en *Agaricus bisporus*. *Biotempo* 5 31-36pp
- Valenzuela V., C., & Arias, J. I. (2012). Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 27(1), 33–47. <https://doi.org/10.5354/0716-260x.2012.21997>
- Varela, Z. S., Lavalle, L. P., & Alvarado, D. E. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: Una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122.

- Vargas-Alvarez, D., Soto-Hernández, M., González-Hernández, V., Mark-Engleman E., & Martínez-Garza, Á. (2006). Cinética de Acumulación y Distribución de Flavonoides en Guayaba (*Psidium guajava* L.) *Agrociencia*, 40 (1) 109-115 pp.
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762–769. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.026>
- Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2015). Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.007>
- Wang, L. Z., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2007). Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9), 1128–1138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01440.x>
- Wang, W., Wang, K., Xiao, J., Liu, Y., Zhao, Y., & Liu, A. (2017). Performance of high amylose starch-composited gelatin films influenced by gelatinization and concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.014>
- Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat - A review. *Meat Science*, 86(1), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.033>

## 9 Artículo No. 1. Antioxidant and antimicrobial capacity of three agroindustrial residues as animal feeds

Agroforest Syst  
https://doi.org/10.1007/s10457-018-00343-7



### Antioxidant and antimicrobial capacity of three agroindustrial residues as animal feeds

Enrique D. Archundia Velarde · Dora L. Pinzón Martínez · Abdelfattah Z. M. Salem · Patricia G. Mendoza García · María D. Mariezcurrena Berasain

Received: 28 June 2018 / Accepted: 20 December 2018  
© Springer Nature B.V. 2019

**Abstract** Currently, different countries' policies prohibit the use of synthetic antibiotics in animal production. As a consequence, researchers have been looking for sources of these molecules in plants, vegetables, and agro-industrial waste in order to inhibit pathogenic microorganisms, such as *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Listeria* and control livestock health. Hydro-alcoholic extracts of the leaves of three different plants- Avocado (*Persea americana* Mill) Hass variety, guava (*Psidium guajava* L.) Calvillo variety, and cherry plum (*Prunus cerasifera* Ehrh) Pissardii variety, at three different ethanol:water ratios (20:80, 50:50, and 80:20 volume/volume) were

analyzed. Total phenols in the extracts were quantified by the Folin-Ciocalteu Method and the inhibitory spectrum test against Gram+: *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Bacillus subtilis* ATCC 662, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp. and Gram-: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica serotipo* Enteritidis ATCC 13076, *Klebsiella* sp. and *Pseudomonas* sp. using the agar well-diffusion method. The highest phenol content and antioxidant capacity were found in the guava leaf extract at 50:50 ( $111.7 \pm 8.8$  EAG mg/mL dry matter,  $450 \pm 3$   $\mu$ M TE/g dry matter), and this was the only extract that showed total inhibitory spectrum activity for all the microorganisms evaluated among the extracts tested, with a range of 0.62–1.25 mg/mL minimal inhibitory capacity (MIC). A hydroalcoholic extract of guava leaves had strong antimicrobial activity against different pathogenic microorganisms and could be considered as a potential alternative to synthetic antibiotics for use in animal production.

**Keywords** Hydroalcoholic extract · Agroindustrial waste · Total phenols · Saponin · Antioxidant capacity · Antimicrobial capacity

E. D. Archundia Velarde  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, Mexico

D. L. Pinzón Martínez ·  
M. D. Mariezcurrena Berasain (✉)  
Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, Mexico  
e-mail: neckane16@hotmail.com

A. Z. M. Salem  
Facultad de Medicina y Veterinaria, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, Mexico

Patricia G. Mendoza García  
Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, Mexico

Published online: 11 February 2019



## Introduction

It has been recognized since the 1940's that animal health and welfare are essential aspects of livestock production, which prevent metabolic disease and improve meat quality. This has led to the excessive use of growth promoters and antibiotics (Akyildiz and Denli 2016). However, increased concern among consumers, coupled with the January 2006 European prohibition of synthetic antibiotics use as growth promoters or animal treatment pathologies in animals intended for human consumption (CE 1831/2003). This has imposed an important challenge on animal producers to find natural sources of substances that have antimicrobial properties and stimulate animal welfare (Pereira et al. 2017). Currently the use of natural alternatives include prebiotics, probiotics, organic acids, essential oils and plant extracts (Akyildiz and Denli 2016).

Plant extracts and essential oils have shown antimicrobial, antioxidant, antiparasitic, anti-inflammatory, antidiarrheal and antifungal properties, improve food conversion and stimulate digestive enzymes when they are used in animal diets (Frankic et al. 2009; Martínez et al. 2015). Cinnamon, oregano, cumin, garlic, clove, anise, mint, coriander, and ginger are the most frequently used spices in animal production (Akyildiz and Denli 2016). These spices' antimicrobial and antioxidant activities depend on their secondary metabolites concentrations such as phenols, saponins, flavonoids, alkaloids, terpenoids and tannins (Díaz-de-Cerio et al. 2016; Li et al. 2016).

While some natural additives have shown favorable results when used in vitro, the use of these additives in vivo as dietary components presents high implementation costs because of the high doses needed (Pereira et al. 2017). However, if similar properties could be found in materials usually considered agroindustrial waste, these products could be used with a lower cost. High antioxidant activity and total phenol concentration have been suggested as an initial screening criterion to find natural sources of dietary additives from agroindustrial waste (Oboh et al. 2016; Yamassaki et al. 2017). Avocado, cherry plum, and guava leaves have been reported to have antioxidant and antimicrobial properties (Rasool et al. 2017; Camarena-Tello et al. 2018; Chen et al. 2018). However, these effects vary widely depending on the growing conditions, extraction method, and a host of

aspects of the chemical composition of the active compounds, such as the quantity, hydroxyl position, molecular weight, particle size, solvent concentration, temperature, contact time and mass-solvent ratio, among others factors (Soto-García and Rosales-Castro 2016; Robles-García et al. 2016), in addition to the family, genus, an even species of plant. As such, the main objective of this study was to determine the antioxidant and antimicrobial activities of Mexican agroindustrial waste from avocado, cherry plum, and guava leaves for potential use as feed additives to improve animal health and welfare.

## Materials and methods

### Plant material

Arboreal leaves were randomly taken from the central branches of young and mature trees from a rural production area during the summer. Leaves with mechanical or biological damage were avoided. Guava (*Psidium guajava* L.) variety Calvillo and avocado (*Persea americana* Mill) Hass variety leaves were collected from Uruapan, Michoacan, Mexico. 19°25'16"N, 102°3'47"W. Cherry plum (*Prunus cerasifera* Ehrh) variety Pissardii leaves were taken from Toluca, Mexico State, Mexico (19°17'32"N, 99°39'14"W). Leaves were dried at 50 °C, 48 h and ground in an electric mill until a 1 mm particle size was achieved.

### Microorganisms used and growth conditions

The microbiological strains included Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (M1), *Bacillus subtilis* ATCC 662 (M2), *Enterococcus* sp. (M3), *Staphylococcus* sp. (M4), and Gram-negative *Escherichia coli* ATCC 25922 (M5), *Salmonella enterica serotipo* Enteritidis ATCC 13076 (M6), *Klebsiella* sp. (M7) and *Pseudomonas* sp. (M8). These organisms were obtained from the collections of the Laboratory of Microbiology of the Technological Institute of Veracruz (Laboratorio de Microbiología, UNIDA, Instituto Tecnológico de Veracruz) Mexico, where they are stored at -40 °C in Luria-Bertani (LB) broth with 40% glycerol as a cryoprotectant. Microorganisms stains used were reactivated in LB broth for 24 h, 37 °C, followed of a second grown in

LB broth for 18 h, 37 °C before beginning each experiment.

#### Preparations of plant extracts

Plant extracts were obtained according to Salem et al. (2011). Hydroalcoholic extractions were made using 1 g dry cherry plum, guava, or avocado leaves per 8 mL of ethanol:water solvent mixture. The stock solvent mixture was made using 20, 50 y 80% ethanol (99/100, analytical grade, Fermont<sup>®</sup>, Monterrey, Mexico). Leaves were macerated at room temperature for 72 h in amber flasks (50 mL screw-capped glass flasks), then placed in a water bath at 39 °C for 30 min and filtered with Whatman N45 filter paper in order to be stored in amber flasks at 4 °C until use.

#### Experimental design

A 3 × 3 completely randomized factorial design using leaves (agroindustrial waste) of *Persea americana* Mill, *Prunus cerasifera* Ehrh and *Psidium guajava* L., in three ethanol:water ratios- 20:80 v/v, 50:50 v/v, 80:20 v/v was used. Total phenol Folin-Ciocalteu determination (TP), saponin quantification (SP), and antioxidant capacity (AC) analyses were carried out by triplicate (details follow).

#### Total phenol Folin-Ciocalteu determination

Total phenol equivalents were estimated by the Folin-Ciocalteu method (Spizzirri 2009; Arizmendi-Cotero et al. 2016). 120 µL plant extract were mixed with 10 mL distilled water. A 120 µL aliquot was mixed with 47.5 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 300 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15% in a 2.5 mL cuvette, and incubated for 15 min. 1080 µL distilled water was added, mixed and allowed to rest for 2 h. Absorbance was measured at 760 nm and total phenolic equivalents were expressed as gallic acid equivalents per g dry matter (DM).

#### Saponins quantification

Secondary metabolites were separated in a separation funnel. 10 mL of hydroalcoholic extract from each plant were mixed with 20 mL of ethyl acetate (99.7/100, analytical grade, Fermont<sup>®</sup>, Monterrey, Mexico) to eliminate phenolic compounds. 20 ml of *n*-butanol (99.9/100, analytical grade, Fermont<sup>®</sup>, Monterrey,

Mexico) was added to the resulting phenol-free mixture to obtain saponins (SP), which were quantified by evaporating the solvent and weighing (Makkar et al. 1998; Salem et al. 2011).

#### Antioxidant capacity

Antioxidant capacity was quantified using ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-acid)] reagent by the Mehta et al. (2014) method. Radical formation was by a reaction of 7 mM ABTS solution and 140 mM potassium persulfate, which was incubated in the dark at 25 °C for 16 h. The fresh radical solution was diluted in analytic grade ethanol to achieve a 0.7 ± 0.02 absorbance reading at 734 nm. 10 mL plant extract was diluted in 100 mL ethanol and 30 mL of this plant extract solution was mixed with 3 mL ABTS radical solution. Absorbance was measured at 734 nm after 6 min reaction, and a Trolox curve pattern was generated to express TEAC mmol/g dry matter.

#### Antimicrobial activity and minimal inhibitory capacity (MIC)

##### Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was tested only for the 50:50 ethanol:water extraction for each plant species, since this was the extraction ratio that had the highest concentration of the secondary metabolites in the analyses described above. Antimicrobial activity was tested using the agar diffusion disc method following the Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) for eight pathogenic microbial strains described above (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 and M8; see "Microorganisms used and growth conditions" section). Microorganisms stains used were inoculated in LB broth for 18 h, 37 °C. Then a 1 mL was taken and used to inoculate a second LB broth for 2 h, 37 °C to reach a microbial concentration of 1 × 10<sup>5</sup> CFU/mL (verified with plate counts). Microbes were inoculated into Petri dishes and LB agar was poured later. 6 mm diameter filter paper discs with 10 µL of leaf extract were plated on the solidified agar and incubated overnight at 4 °C, then incubated again at 37 °C for 24 h. All samples were analyzed by triplicate. Antimicrobial activity was estimated by measuring the

transparent inhibition zone around each filter paper disc.

#### Minimal inhibitory capacity

The MIC was only quantified for the 50:50 v/v guava leaf extract because it was the only extract that showed antimicrobial capacity in the test described in the previous section. The MIC was quantified with a Microplate Reader (Microplate 5.0, BIORAD) using the kinetic growth protocol of each microorganism. The extract was analyzed at 0.31, 0.62, 1.25, 1.87 and 2.60 mg DM/mL concentrations as the antimicrobial solution. Sterile 96-well microplates were used. Negative control (50  $\mu$ L antimicrobial solution + 150  $\mu$ L LB broth), test assay (50  $\mu$ L inoculum + 50  $\mu$ L antimicrobial solution + 150  $\mu$ L LB broth), positive control (50  $\mu$ L inoculum + 150  $\mu$ L LB broth) and positive blank (150  $\mu$ L LB broth) were run for each sample determination. Absorbance was measured at 655 nm at 37 °C every 30 min until the sensitive microorganisms tested reached its stationary phase. Results were expressed in mg/g dry mass and calculated based on microorganism adaptation phase increase (Andrews 2001).

## Results

#### Quantification of secondary metabolites and antioxidant capacity

Table 1 shows the results of the multifactorial ANOVA ( $P \geq 0.05$ ) including as factors the concentration, plant species, and their interaction. There were

**Table 1** Multifactorial analysis of the effects of extract concentration (20:80, 50:50, and 80:20 ethanol:water ratio), species (avocado, guava, and plum), and their interaction on

Factor	DF	Total phenol	Saponins	Antioxidant capacity
	Sum of squares			
Concentration	2	7053*	13,194*	445,410*
Plant species	2	7,2655*	503	38,283*
Interaction	4	136*	3,51*	205,710*
Total	26	14,8435	22,367	766,531

DF Degrees of freedom

\*Significant effect of the factor

significant effects over the concentration and the concentration  $\times$  species interaction ( $P \geq 0.05$ ) for response variables TP, SP, and AC studied. Plant species had a significant effect over TP and AC, but not for SP ( $P \geq 0.05$ ) variable. Upon detecting significant effects in the overall test of means using a Tukey's test (95%) (Table 2). Concentration factors TP, SP, and AC were higher when using 50:50 ethanol:water ratio (TP = 89.9 mg GAE/g DM, SP = 105.1 mg/g DM and AC = 421.9 mM TEAC/g D) than for the 20:80 (TP = 52.9 mg GAE/g DM, SP = 39.4 mg/g DM and AC = 204.7 mM TEAC/g DM) or 80:20 extractions (TP = 56.0 mg GAE/g DM, SP = 48.02 mg/g DM and AC = 271.8 mM TEAC/g DM; Table 2). In Specie factor, guava leaves had the highest values (TP = 86.88 mg GAE/g DM, SP = 69.1 mg/g DM and AC = 332.0 mM TEAC/g DM), followed by avocado (TP = 63.77 mg GAE/g DM, SP = 67.47 mg/g DM, and AC = 299.7 mM TEAC/g DM), then cherry plum (TP = 47.49 mg GAE/g DM, SP = 63.1 mg/g DM and AC = 266.8 mM TEAC/g DM).

Concentration and species interaction results are shown in Table 3. Concentration-species combination with the highest values was guava in 50:50 ethanol:water ratio (TP =  $111.7 \pm 8.8$  mg GAE/g DM, SP =  $88.5 \pm 6.9$  mg/g DM and AC =  $450.3 \pm 18$   $\mu$ M TEAC/g DM). The remaining interactions were as follows, in decreasing order: avocado leaf at 50:50 (TP =  $82.47 \pm 6.2$  mg GAE/g DM, SP =  $113.15 \pm 20$  mg/g DM, AC =  $446.7 \pm 18$   $\mu$ M TEAC/g DM), guava leaf at 80:20 (TP =  $76.40 \pm 3.7$  mg GAE/g DM, SP =  $52.55 \pm 5.8$  mg/g DM, AC =  $407.8 \pm 7$   $\mu$ M TEAC/g DM), plum leaf at 50:50 (TP =  $73.29 \pm 4.8$  mg GAE/g DM, SP =  $113.15 \pm$

total phenols, saponins, and antioxidant capacity among hydroalcoholic leaf extracts

**Table 2** Total phenol, saponins, and antioxidant capacity by species and ethanol:water ratio in leaf extracts, analyzed using a multifactorial analysis

Factor	Total phenol (mean mg GAE/g DM)	Total saponins (mean mg/g DM)	Antioxidant capacity (mean $\mu$ M TEAC/g DM)
Concentration (ethanol:water ratio of the extract)			
20:80	52.9 <sup>a</sup>	39.4 <sup>a</sup>	204.7 <sup>a</sup>
50:50	89.2 <sup>b</sup>	105.1 <sup>c</sup>	421.9 <sup>c</sup>
80:20	56.0 <sup>a</sup>	48.0 <sup>b</sup>	271.8 <sup>b</sup>
Plant species			
Avocado	63.7 <sup>b</sup>	67.4 <sup>a</sup>	299.7 <sup>ab</sup>
Cherry plum	47.4 <sup>a</sup>	63.1 <sup>a</sup>	266.8 <sup>a</sup>
Guava	86.8 <sup>c</sup>	69.1 <sup>a</sup>	332.0 <sup>b</sup>

DM Dry matter

<sup>a,b,c</sup>Within columns, cells that do not share letters are significantly different**Table 3** Interaction of concentration and species in total phenols, total saponins and antioxidant capacity of hydroalcoholic leaf extracts at three different ethanol:water ratios

Specie	Concentration (ethanol/water) v/v	Total phenol (mg GAE/g DM)	Saponins (mg/g DM)	ABTS antioxidant capacity ( $\mu$ M TEAC/g DM)
Avocado leaves	20–80	52.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	37.6 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	265.4 $\pm$ 57 <sup>c</sup>
	50–50	82.47 $\pm$ 6.2 <sup>d</sup>	113.15 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	446.7 $\pm$ 18 <sup>de</sup>
	80–20	56.1 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	51.23 $\pm$ 6.7 <sup>ab</sup>	187.1 $\pm$ 38 <sup>ab</sup>
Cherry plum leaves	20–80	33.61 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	35.85 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	210.8 $\pm$ 33 <sup>abc</sup>
	50–50	73.29 $\pm$ 4.8 <sup>c</sup>	113.15 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	368.9 $\pm$ 59 <sup>d</sup>
	80–20	35.5 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	40.33 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	220.6 $\pm$ 51 <sup>bc</sup>
Guava leaves	20–80	72.51 $\pm$ 5 <sup>c</sup>	44.65 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	138.0 $\pm$ 51 <sup>a</sup>
	50–50	111.7 $\pm$ 8.8 <sup>e</sup>	88.5 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	450.3 $\pm$ 18 <sup>e</sup>
	80–20	76.40 $\pm$ 3.7 <sup>cd</sup>	52.55 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	407.8 $\pm$ 7 <sup>de</sup>

DM Dry matter

<sup>a,b,c,d,e</sup>Within columns, cells that do not share letters are significantly different from each other

2.5 mg/g DM, AC = 368.9  $\pm$  59  $\mu$ M TEAC/g DM), guava leaf at 20:80 (TP = 72.51  $\pm$  5 mg GAE/g DM, SP = 44.65  $\pm$  2.7 mg/g DM, AC = 138.0  $\pm$  51  $\mu$ M TEAC/g DM), avocado leaf at 80:20 (TP = 56.1  $\pm$  1.6 mg GAE/g DM, SP = 51.23  $\pm$  6.7 mg/g DM, AC = 187.1  $\pm$  38  $\mu$ M TEAC/g DM), avocado leaf at 20:80 (TP = 52.7  $\pm$  0.1 mg GAE/g DM, SP = 37.6  $\pm$  5.3 mg/g DM, AC = 265.4  $\pm$  57  $\mu$ M TEAC/g DM), plum leaf at 80:20 (TP = 35.5  $\pm$  3.6 mg GAE/g DM, SP = 40.33  $\pm$  5.8 mg/g DM, AC = 220.6  $\pm$  33  $\mu$ M TEAC/g DM), and plum leaf at 20:80 (TP = 33.61  $\pm$  0.1 mg GAE/g DM, SP = 35.85  $\pm$  1.2 mg/g DM, AC = 210.8  $\pm$  33  $\mu$ M TEAC/g DM).

#### Antimicrobial activity

Table 4 shows the inhibition halos sizes due to the antimicrobial activity using agar disc diffusion method with the three plant species proved in eight microorganism's strains. Note that only the 50:50 concentration was used since this was the concentration with the highest TP, SP, and AC in the previous tests. Guava leaf extract had the strongest antimicrobial activity against all of the microbial strains evaluated since the inhibition halos were larger than 6 mm, the diameter of the sensidisc used. While the guava leaf extract had good antimicrobial capacity against all of the Gram+ and Gram- bacteria tested, it was particularly effective against *Klebsiella* sp. (17  $\pm$  0.71 mm) compared to the remaining strains (16  $\pm$  0.71 mm for *B. subtilis* and *E. coli*,

**Table 4** Antimicrobial activity based on diffusion disc test from hydroalcoholic leaf extracts

Microorganisms	Guava leaves $\bar{X} \pm SD$ Halo in (mm)	Avocado leaves	Cherry plum leaves
<b>Gram positive</b>			
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	15.2 $\pm$ 0.45	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 662	16 $\pm$ 0.71	–	–
<i>Enterococcus</i> sp.	15.6 $\pm$ 0.55	–	–
<i>Staphylococcus</i> sp.	15.6 $\pm$ 0.55	–	–
<b>Gram negative</b>			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16 $\pm$ 0.71	–	–
<i>Salmonella enterica serotipo</i> Enteritidis ATCC 13076	14.6 $\pm$ 0.55	–	–
<i>Klebsiella</i> sp.	17 $\pm$ 0.71	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp.	14.8 $\pm$ 0.84	–	–

Inhibition areas,  $\bar{X} \pm SD$  = average of three replicates  $\pm$  standard deviation. Disc diameter was 6 mm

“–” No inhibitory activity

15.6  $\pm$  0.55 for *Enterococcus* sp and *Staphylococcus* sp, 15.2  $\pm$  0.45 for *Listeria Monocytogenes*, 14.8  $\pm$  0.84 for *Pseudomonas* sp., and 14.6  $\pm$  0.55 for *Salmonella enterica serotipo* Enteritidis ATCC 13076). Avocado and plum extracts showed no antimicrobial activity.

#### Minimal inhibitory capacity (MIC)

The MIC results test are shown in Table 5. Analyses were only carried out for guava leaf extract (50:50 concentration) since this was the only species that showed antimicrobial activity. Six of the microbial strains were inhibited by guava extract at 0.62 mg/mL,

*Staphylococcus* sp. and *Salmonella enterica serotipo* Enteritidis ATCC 13076 were inhibited at 1.25 mg/mL.

#### Discussion

Total phenols, saponins, and antioxidant capacity were all affected by the interaction of concentration and plant species. With respect to the concentration factor is shown that the highest concentrations of TP, SP, and AC were obtained with a 50:50 ethanol:water ratio. This may be due to the different polarities of the solvents used; ethanol is a medium-polarity solvent

**Table 5** MIC and from guava leaf extract

Microorganisms	Guava leaves (mg/mL)
<b>Gram positive</b>	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	0.62
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 662	0.62
<i>Enterococcus</i> sp.	0.62
<i>Staphylococcus</i> sp.	1.25
<b>Gram negative</b>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0.62
<i>Salmonella enterica serotipo</i> Enteritidis ATCC 13076	1.25
<i>Klebsiella</i> sp.	0.62
<i>Pseudomonas</i> sp.	0.62

Minimal inhibitory capacity (MIC) of guava leaf extract



and water is a high-polarity solvent. The different secondary metabolites of all three species are attracted to solvents of a more similar polarity to a 50:50 mixture of ethanol and water, compared to when a higher concentration of either solvent is used (Masschelein-Kleiner 2004). These results are consistent with those from Kiassos et al. (2009) who, in a similar study in onion also found that TP and AC values were highest when a 50:50 ratio of ethanol:water was used. In addition, because ethanol:water provides efficient extraction of secondary metabolites at a lower cost, it is considered a relatively low-toxicity, sustainable, and cost-effective solvent compared to other non-polar solvents such as methanol and acetone that are often used for this type of extraction (Amyrgialaki et al. 2014).

There were no significant differences for plant species and SP among the species ( $P \geq 0.05$ ), but guava leaves had higher TP and AC values than avocado and cherry plum leaves. These suggested results are proposed due to the diversity of secondary metabolites reported in leaves. In a guava leaves secondary metabolite research up to 72 secondary metabolites were detected; the main metabolites related to TP and AC were Gallic acid, Catechin, Gallocatechin, Procyanidin B Isomer, Morin, Ellagic acid, Quercetin, glucuronide, Reynoutrin, Guajaverin and Avicularin (Qian and Nihorimbere 2004; Díaz-de-Cerio et al. 2016). Other factors that may also play a role are agro-climatic conditions since the presence of secondary metabolites is related to stress or conditions which threaten the plant's homeostasis, as well as the plant genus, family, and even species (Robles-García et al. 2016; Domingo and López-Brea 2003).

With respect to the concentration-by-species interaction, the highest levels of TP and AC were found in guava leaf extract in 50:50 ethanol:water, followed by guava leaf extract at 80:20 ethanol:water, avocado leaves at 50:50 and cherry plum at 50:50. All of these values are higher than values reported for other plants in similar studies (e.g. Lu et al. 2011 and Gorinstein et al. 2008): *garlic*: TP =  $19.40 \pm 1.2$  mg GAE/g DM, AC =  $43.73 \pm 1.7$   $\mu$ M TE/g DM, *ginger*: TP =  $9.20 \pm 0.5$  mg GAE/g DM, AC =  $75.66 \pm 1.1$   $\mu$ M TEAC/g DM, *cumin*: TP =  $9.00 \pm 0.1$  mg GAE/g DM, AC =  $57.41 \pm 2.7$   $\mu$ M TEAC/g DM, *cinnamon*: TP =  $45.24 \pm 2.4$  mg GAE/g DM, AC =  $525.85 \pm 27.6$   $\mu$ M TEAC/g DM and *anise*: TP =  $14.94 \pm 0.1$  mg GAE/g DM, AC =  $188.13 \pm 6.2$   $\mu$ M TEAC/g

DM, with the exception of AC in *cinnamon*. Spices including *cinnamon*, *oregano*, *cumin*, *garlic*, *cloves*, *anise*, *mint*, *coriander*, and *ginger* are the most widely used as feed additives for animal production in order to manipulate rumen function and improve feed conversion (Akyildiz and Denli 2016). On the other hand, the oxidative stability of animal feeds depend on the antioxidant capacity ingredients, present either as natural components of the feed or added specifically, to avoid the oxidation of compounds like lipids and vitamins (Frankič et al. 2009). A hydroalcoholic extract of guava leaf could, therefore, be considered as a natural additive with high antioxidant capacity, which could improve the oxidative stability of feeds and therefore improve weight gain efficiency.

With respect to the variable SP, the highest concentrations were in the avocado and plum 50:50 extracts, followed by the guava leaf 50:50 extract, showing that all three of these agro-industrial waste products are important sources of saponins, compounds which at appropriate concentrations can help inhibit protozoans in the rumen, reducing methanogenesis. This is beneficial both because it increases the energy efficiency of ruminal metabolism and because it reduces methane gas emissions into the environment (Holtshausen et al. 2009).

#### Antimicrobial capacity

Only guava leaf extract had antimicrobial activity in this study. Inhibition diameters were between 14 and 17 mm in eight Gram+ and Gram- organisms. These results are similar to those of other extracts used in animal feed, such as *cinnamon*, *clove*, *garlic*, *ginger*, *mint*, and *mustard*, whose ranges were from 9 to 18 mm (Tajkarimi et al. 2010). With respect to the results of this study, it should be noted that Gram-microorganisms (*E. coli*, *Salmonella*) are related to high neonatal mortality indices due to diarrhea in ruminants (Barrington et al. 2002), piglets (Mantecón and Ahumada 2000), and chickens (Geetha and Palanivel 2018). Among Gram+ microorganisms, the most important are *L. monocytogenes*, which leads to encephalitis, and uterine infections that can lead to abortion in ruminants (Nightingale et al. 2004) and *Staphylococcus* sp., which leads to several different animal pathologies in ruminants, swine, and chickens (Smith 2015). As such, based on our in vitro results, a 50:50 hydroalcoholic extract of guava leaf could be

used to decrease the prevalence of these microorganisms in live animals in order to improve their homeostasis and weight gain, and could be considered as a possible broad-spectrum antibiotic.

#### Minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) of guava leaf extract for Gram negative (*E. coli*, *Salmonella enterica serotipo* Enteritidis ATCC 13076, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp.) and Gram+ (*L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp.) strains tested was between 0.62 and 1.25 mg/mL, demonstrating wide spectrum inhibition at low doses. Compared to other natural antibiotics studied by Kittisakulnam et al. (2017) and Baljett et al. (2015) such as garlic (8.8 mg mL<sup>-1</sup>), pepper (560 mg/mL), ginger and cumin (both 12.5 mg/mL), guava is effective at lower doses. This effect may be explained by the secondary metabolites antimicrobial capacity to rupture the cell wall or disturb the intracellular matrix, leading to microorganism's death (Biswas et al. 2013).

#### Conclusions

The results of this study show that a 50:50 ethanol:water extract of guava leaf is the most effective species-concentration combination among those tested, showing the highest total phenol concentration, antioxidant capacity, and inhibition of eight microorganisms. As such, we suggest that it may be a viable substitute for synthetic antibiotics and could be used in different animal species to decrease pathologies related to Gram- and Gram+ microorganisms. In addition, this extract presented excellent antioxidant capacity, which could be used to increase the oxidative stability of animal feeds, and therefore the efficiency of weight gain. It is also a source of saponins, which could help decrease methanogenesis and increase the energy efficiency of digestion in livestock, decreasing the emission of methane gas into the environment. Further tests in vitro and tests in vivo are required to test the effects of this extract in different animal species.

**Acknowledgements** Authors would like to thank the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT) for providing a scholarship to the main author. Thanks to the *Facultad de*

*Ciencias Agrícolas* at the *Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México* for Access to laboratories to carry out the study and to the *Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA)* of the *Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, México* for access to the microbial strains and microbiology laboratory.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### References

- Akyildiz S, Denli M (2016) Application of plant extracts as feed additives in poultry nutrition. *Ser D Anim Sci* 59:72–74
- Amyrgialaki E, Makris DP, Mauromoustakos A, Kefalas P (2014) Optimization of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolic using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Ind Crops Prod* 59:216–222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.011>
- Andrews JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48(suppl. S1):5–16
- Arizmendi-Cotero D, Gómez-Espinoza RM, Dublán-García O, Gómez-Vidales V, Domínguez-López A (2016) Electron paramagnetic resonance study of hydrogen peroxide/ascorbic acid ratio as initiator redox pair in the inulin-gallic acid molecular grafting reaction. *Carbohydr Polym* 136:350–357
- Baljett SY, Simmy G, Ritika Y, Roshanlal Y (2015) Antimicrobial activity of individual and combined extracts of selected spices against some pathogenic and food spoilage microorganisms. *Food Res Int* 22(6):2594–2600
- Barrington GM, Gay JM, Evermann JF (2002) Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Vet Clin Food Anim* 18:7–34. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00005-1)
- Biswas B, Rogers K, McLaughlin F, Daniels D, Yadav A (2013) Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *Int J Microbiol*. <https://doi.org/10.1155/2013/746165>
- Camarena-Tello JC, Martínez-Flores HE, Garnica-Romo MG, Padilla-Ramírez JS, Saavedra-Molina A, Alvarez-Cortés O, Bartolomé-Camacho MC, Rodile-López JO (2018) Quantification of phenolic compounds and in vitro radical scavenging abilities with leaf extracts from two varieties of *Psidium guajava* L. *Antioxidants* 7(34):1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox7030034>
- Chen FF, Sang J, Zhang Y, Sang J (2018) Development of a green two-dimensional HPLC-DAD/ESI-MS method for the determination of anthocyanins from *Prunus cerasifera* var. *atropurpurea* leaf and improvement of their stability in energy drinks. *Int J Food Sci Technol*. <https://doi.org/10.1111/jifs.13730>
- CLSI Clinical and Laboratory Standar Institute (2012) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.

- Approved standard, 7th edn, document M02-A11, vol 32, no 1. Accessed 22 June 2018
- Commission European (2003) Regulation of the European parliament and the council of additives for use in animal nutrition. *Off J Eur Union* 268:29–43
- Díaz-de-Cerio E, Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A (2016) Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *J Funct Foods* 22:376–388. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.040>
- Domingo D, López-Brea M (2003) Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioter* 16(4):385–393
- Frankič T, Voljč M, Salobir J, Rezar V (2009) Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agric Slov* 94(2):95–102
- Geetha M, Palanivel KM (2018) A brief review on salmonellosis in poultry. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 7(05):1269–1274. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.153>
- Gorinstein M, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Najman K, Drzewiecki J, Cvikrová M, Martincová O, Katrič E, Trakhtenberg S (2008) Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *J Agric Food Chem* 56(12):4418–4426. <https://doi.org/10.1021/jf800038h>
- Holtshausen L, Chaves AV, Beauchemin KA, McGinn SM, McAllister TA, Odongo NE, Cheeke PR, Benchaar C (2009) Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J Dairy Sci* 92(6):2809–2821. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1843>
- Kiassos E, Mylonaki S, Makris DP, Kefalas P (2009) Implementation of response surface methodology to optimize extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Innovative. Innov Food Sci Emerg Technol* 10:246–252
- Kittisakulnam S, Saetae D, Suntorsuk W (2017) Antioxidant and antibacterial activities of spices traditionally used in fermented meat products. *J Food Process Preserv* 41:1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13004>
- Li S, Wang P, Yuan W, Su Z, Bullard SH (2016) Endocidal regulation of secondary metabolites in the producing organisms. *Sci Rep* 6:1–17. <https://doi.org/10.1038/srep29315>
- Lu M, Yuan B, Zeng M, Chen J (2011) Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Res Inter* 44(2):530–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.055>
- Makkar HPS, Sen S, Blummel M, Becker K (1998) Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation. *J Agric Food Chem* 46:4324–4328. <https://doi.org/10.1021/jf980269q>
- Mantecón T, Ahumada A (2000) Diarrea mecánica de porcino en lactancia y postdestete. *Mundo Ganadero*, Eumedía. Madrid, España. Febrero 1(119):48–50
- Martínez R, Ortega ME, Herrera JG, Kawas JR, Zárate JJ, Robles RS (2015) Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia* 40(11):744–750
- Masschelein-Kleiner L (2004) Les solvants. Dirección de Bibliotecas Archivos y Museos, Centro Nacional de Conservación y Restauración Propiedad Intelectual No. 138.776, ISBN: 956-244-166-0
- Mehta S, Soni N, Satpathy G, Gupta RK (2014) Evaluation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of dried plum (*Prunus domestica*). *J Pharmacogn Phytochem Title* 3(2):166–171
- Nightingale KK, Schukken HY, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, McDonough PL, Wiedmann M (2004) Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol* 70(8):4458–4467
- Oboh G, Odubanjo VO, Bello F, Ademosun AO, Oyeleye SI, Nwanna EE, Ademiluyi AO (2016) Aqueous extracts of avocado pear (*Persea americana* Mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities *in vitro*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 27(2):131–140. <https://doi.org/10.1515/jbcp-2015-0049>
- Pereira V, Chapel JM, Rodríguez-Bermúdez R, Orjales I, Domínguez R, Vázquez P (2017) Los extractos vegetales son una alternativa natural a los antibióticos. Sitio Argentino de Producción Animal. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar). Accessed 15 June 2018
- Qian H, Nihorimbere V (2004) Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J Zhejiang Univ Sci* 5:676–683
- Rasool M, Malik A, Arooj M, Alam MZ, Alam Q, Awan M, Asif M, Qazi MH, Zaher A, Khan SU, Haque A, Pushparaj PN, Choudhry H, Jamal MS (2017) Evaluation of antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Azadirachta indica* and *Psidium guajava* against clinically important bacteria at varying pH and temperature. *Biomed Res* 28:134–139. <https://doi.org/10.5812/ajcmi.12987>
- Robles-García MA, Aguilar AJ, Gutiérrez-Lomelí M, Rodríguez-Félix F, Morales-Del-Río JA, Guerrero-Medina PJ, Madriga-Pulido JA, Del-Toro-Sánchez CL (2016) Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri pittier*). *Biotecnica* 17(3):3–8. <https://doi.org/10.18633/biotecnica.v18i3.328>
- Salem AZM, Olivares M, López S, González-Ronquillo M, Rojo R, Camacho LM, Cerrillo SMA, Mejía HP (2011) Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. *Anim Feed Sci Technol* 170:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.08.002>
- Smith TC (2015) Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: the United States experience. *PLoS Pathog* 11(2):1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004564>
- Soto-García M, Rosales-Castro M (2016) Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxy* la BARK. *Maderas Cienc Tecnol* 18(4):701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Spizzirri UG, Iemma F, Puoci F, Cirillo G, Curcio M, Parisi OL, Picci N (2009) Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin. *Biomacromol* 10:1923–1930. <https://doi.org/10.1021/bm900325t>
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*

21:1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>

Yamassaki FT, Campestrini LH, Zawadzki-Baggio SF, Maurer JBB (2017) Avocado leaves: influence of drying process, thermal incubation, and storage conditions on preservation of polyphenolic compounds and antioxidant activity. *Int J*

*Food Prop* 20(S2):S2280–S2293. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1369105>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**10 Artículo No. 2 (En proceso de publicacion) Development and  
characterization of an edible biofilm of Gelatin-Chitosan with guava leaf  
extract used to increase the shelf life of beef**

1 **Development and characterization of an edible biofilm of Gelatin-Chitosan**  
2 **with guava leaf extract used to enhance the shelf life of beef**

3  
4 Enrique D. Archundia Velarde, Dora L. Pinzón Martínez, Abdelfattah Z. M. Salem, María D.  
5 Mariezcurrena Berasain y Raúl A. Morales Luckie

6  
7 E. D. Archundia Velarde Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y  
8 Recursos Naturales, Universidad Autónoma del Estado de México, instituto literario N° 100,  
9 Toluca, Estado de México, México,

10 M. D. Mariezcurrena Berasain Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del  
11 Estado de México, Instituto Literario N° 100, Toluca, Estado de México, México e-mail:  
12 [nekkane16@hotmail.com](mailto:nekkane16@hotmail.com) \*

13 D. L. Pinzón Martínez, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de  
14 México, Instituto Literario N°. 100, Toluca, Estado de México, México

15 A. Z. M. Salem, Facultad de Medicina y Veterinaria, Universidad Autónoma del Estado de  
16 México, Toluca, Instituto Literario N° 100, Estado de México, México

17 R. A. Morales Luckie, Centro Conjunto en Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM,  
18 Carretera Km. 14.5, Unidad San Cayetano Toluca, Estado de México, México

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28 **Abstract**

29 Nowadays it has been created bioplastic and they have been used such as  
30 packing, instead of conventional packages, these are friendly to the environment  
31 and consumer's health. Among the most used polymeric basis nowadays, for the  
32 elaboration, are proteins and carbohydrates for its plastic characteristic.  
33 However, there were developed biofilms made of gelatin-chitin and others which  
34 have been done actives with hydroalcoholic extract from the guava leaf (*Psidium*  
35 *guajava* L). The aim of this study was to evaluate the effect of guava leaf extract  
36 within the biofilms on the beef meat characterization. Both biofilms were  
37 characterized and compared among each other, on optical properties,  
38 mechanical, morphological and thermic ones. The aerobic mesophylls effects,  
39 coliforms and life color in shelf meat were also cuantificated. With these results it  
40 was observed that the biofilms show a loss (\*P<0.05) in resistance to tension in  
41 the biofilms with extract. As for optical properties both show high transparency  
42 (\*P<0.05) even if biofilms with extract show brownish and grayish. Regarding to  
43 the permeability, both biofilms seem to be suitable at water steam and to oxygen.  
44 Addition of guava extract to biofilms improved (\*P<0.05) the meat life's usage  
45 and reduce (\*P<0.05) microbial contamination as well as improved ((\*P<0.05) its  
46 color characteristics compared to the commercial biofilms. In conclusion, it is  
47 suggested that the antioxidant and antimicrobial capacity of the extracts present  
48 in the active biofilms inhibits and maintains the physicochemical characteristics  
49 for a longer period in the shelf life of beef.

50  
51 Key words: meat, packages, active biofilms, guavas leaf extract, gelatin,  
52 glucosamine.

53

54

55

56

57

58

59

60

61

## 62 1 Introduction

63 Beef meat is essential in human diet because it's nutritional quality.  
64 However, it is a degradable product due to oxygen and microorganisms, of which,  
65 give a risk to the food's quality and innocuity. Currently there have been used  
66 plastic packages to protect these products because of its high structural  
67 properties. For examples, clearness, barrier to water, oxygen and  
68 microorganisms, just as its mechanic properties. However, one of the biggest  
69 problems nowadays generated to the environment is because of the  
70 indiscriminate usage of this plastic packages derived of petrochemicals basis,  
71 from unbiodegradable and unrenovable, that affects life integrity and natural  
72 resources of the planet (Wang et al. 2017; Nur et al., 2014). Taking this into  
73 account, these polymers also harm in a direct way the consumer's health to carry  
74 undesirable substances (monomers, plasticizers, synthetic antioxidants,  
75 additives and colorings).  
76

77 Recently there has been a rise in interest to the biodegradable films making  
78 (biofilms) and when they go off due to the microorganism effect that generates  
79 water, carbon, methane and biomass from sustainable nature, wide availability  
80 and plentiful and highly compostable (Ramos et al., 2016; Nur et al., 2014). In  
81 addition, that they avoid the moisture loss and aroma, the transport of solutes  
82 and water absorption and oxygen to the nutritional origin, protection properties,  
83 preservation and the information about that conventional plastic packages offer  
84 (Cazón et al., 2017).

85 Physicochemical characteristics that a bioplastic presents in the food  
86 industry is influenced by the sort of raw material (proteins, carbohydrates and  
87 lipids). The composition and molecular besides the kind of solvent, pH,  
88 components concentration and temperature. However, they previously make, just  
89 like the kind of concentration of additive plasticizers, optical, gas barriers O<sub>2</sub> and  
90 CO<sub>2</sub> and structural resistance to water and microorganisms (Seixas et al., 2013,  
91 Falguera et al., 2011).

92 Two of the most used polymeric bases to produce biofilms due to its  
93 physicochemical characteristics in the world. It has the chitin ( $\beta$ -(1-4)-2-  
94 acetamido-d-glucose and  $\beta$ -(1-4)-2-amino-d-glucose) and gelatin. The first one  
95 is a soluble carbohydrate in acid solution, derived from the obtained chitin from  
96 the crustacean and cell wall from fungus diacetylene in an alkaline environment  
97 (Moura et al., 2015; Elsabee y Abdou, 2013). The antimicrobial properties of high  
98 spectrum against bacterium Gram-positive and Gram-negative of alimentary  
99 matter (Aider, 2010), antioxidant capacity (Ngo y Kim, 2014) and low toxicity,  
100 among to be biodegradable ready to be degradable by human enzymes, as  
101 regards to its physical characteristics a biofilm made from chitin is bioadhesible,  
102 transparent and clourless (Valenzuela y Arias., 2012).

103 The second base is the gelatin, that is a mixture of peptides and proteins  
104 produced by partial hydrolysis of collagen water soluble derived from skin, with  
105 conjunctive tissue, animal bones and fish or insect remains (Gómez-Guillén et  
106 al., 2009; Mariod et al., 2013). The characteristics of this base depend on the  
107 source obtained, animal's age, sort of collagen, besides aminoacid composition,  
108 just like the presence of protein fragments of less molecular weight (Hanani et  
109 al., 2014). An elaborated biofilm with this raw material shows good optical  
110 condition (transparency), mechanical (major flexibility), barrier to permeability of  
111 oxygen and water and to be considered such a good base to be bioactive  
112 elements carrier.

113 Even if both polymeric bases, collagen and chitin do not exist together like  
114 mixtures in nature, they can be mixed artificially to produce biofilms that possess  
115 mechanical properties and unique structures in the packaging formation  
116 (Sionkowska et al., 2004).

117  
118 Due to the properties above mentioned, these biofilms can still be  
119 improved in their functional characteristics it can be added with extracts or  
120 essential oils from plants with antimicrobial or antioxidant properties (Sadaka et  
121 al., 2013). Some species that have been used in biofilms because of its  
122 antimicrobial capacity or antioxidant are pepper, rosemary, garlic, clove,  
123 cinnamon, thyme (Valdez et al., 2015) oregano, lavender, (Martucci et al., 2015).



124 However, these species are used nowadays for the food, pharmaceutic and  
125 chemical industry that is why raises its price like bioactive products. On the other  
126 hand, in a previous work Archundia et.al, (2019) it is suggested that the guava's  
127 leaves that are considered such as agroindustry remain presented better  
128 antimicrobial and antioxidant properties in comparison to the previously  
129 described species to a lower cost. Derived from this, the goal of this paper was  
130 to develop and characterize a biofilm based on a gelatin-chitin mixture activated  
131 with extract from the guava's leaf that increases shelf's life in bovine's meat.

## 132 **2 Materials and methods.**

### 133 **2.1 Materials.**

134 It was used the gelatin from skin and cow's leather and pig type A (Blom  
135 290), Mexican brand Coloidales Duché® S.A de C.V., (Ciudad de México,  
136 México) Chitin from shrimp exoskeleton SIGMA AIDRICH® brand, purified  
137 glyceride 99.0 SIGMA AIDRICH® brand, Tween 80 (oleic acid, aprox 70% SIGMA  
138 AIDRICH® brand, acetic acid to 99% analitic degree Fermont® brand, Monterrey,  
139 México).

### 140 **2.2 Biofilms elaboration from chitin gelatin.**

141 There were made two biofilms, one of them was chitin gelatin without extract  
142 (BSE) ( Figure 1) and the other was chitin gelatin with hydroalcoholic extract form  
143 guava's leaves (BCE) (Figure 2) following the methodology the casting,  
144 mentioned by Sanchez et al., (2015) with some changes. For this reason it was  
145 made a solution to the 2% of chitin in distilled water to 75 °C to an acidified way  
146 pH 3.5 (through addition of 2 ml of acetic acid). Afterwards 8 g of gelatin were  
147 added and shake for 10 min with permanent temperature, subsequently the  
148 temperature was reduced to 30 °C and 5 ml of glycerol and 0.6 ml of Tween 80  
149 were added leaving 10 min in shake, maintaining the temperature. The biofilms  
150 were activated to add 4 ml of hydroalcoholic extract (50-50 v/v) of guava's leaves.  
151 Then it was subjected to a dispavorization by means of emptiness for 1 h  
152 maintaining the temperature to 30 °C and there were added 20 ml in tempered

153 glass molds of 15 x 10 cm letting drained in stove of forced air during 24 h to 30  
154 °C.



155

156

157

**Figure 1.** Biofilms without extract

**Figure 2.** Biofilms with guava leaf extract

### 158 **2.3 Biofilms characterization**

159 All the studies were made in triplicate.

#### 160 **2.3.1 Thickness in Biofilms**

161 Thickness in biofilms was measured using a digital hand micrometer  
162 (Mitutoyo IP 65, Model 293-348-30 Mitutoyo Corp., Kawasaki-shi, Japan) with an  
163 accuracy 0.00005 to 0.001mm, according to the described technique by Arfat et  
164 al., (2014). For this analysis there were made 10 measurements randomly of  
165 each repetition.

#### 166 **2.3.2 Biofilm mechanical properties**

167 There were measured resistance and tension (TS) and elongation or  
168 Modulo de Young (E) of biofilms (20 mm x 150mm) using a texture analyzer  
169 TA.XT2 plus (Stable Micro Systems, United Kingdom) with a charge of 49.3 N,  
170 equipped cells with traction rags (model A / TG) following the standard method

171 ASTM D882-02. The grabbing separation was established in 30 mm and the  
172 velocity of the controller was 2mm/g. TS y E were tested in 10 samples of each  
173 biofilm repetition.

### 174 **2.3.3 Optical properties in biofilms.**

#### 175 **2.3.3.1 Color (L\*, a\* y b\*)**

176 Color measurement was done using the described technique by Wang et  
177 al., (2017) and Ahmad et al., (2015). Throughout a colorimeter Konica Minolta  
178 brand, Osaka, Japan model Chromameter CR-400, which uses a light up C, D65  
179 and a lightening system dim/angle of vision 0° through system CIELAB,  
180 Luminosity (L\*), Red(a\*), Yellow (b\*) following the described technique of the total  
181 difference in color calculated by the following equation

182

$$183 \quad \Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

184

185 Where  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  are the difference among the parameters belonging to  
186 each sample samples' color and the standard which is the color's white paper  
187 that was used as base to measure presented the following values ( $L^* = 89.99$ ,  $a^*$   
188  $= -0.23$ ,  $b^* = -8.94$ ). For this analysis 10 random measurements of each  
189 repetition were made.

#### 190 **2.3.3.2 Transparency**

191 It was calculated trough spectrophotometry following the described  
192 technique by Wang et al., (2017),the taken absorbency was made to 600 nm  
193 using UV-vis spectrometer model G10s uV-vis, Genesys, Madison, USA)  
194 according to the following equation.

195

$$196 \quad T = \frac{A_{600}}{M} \quad (2)$$

197

198 Where  $A_{600}$  is the absorbency to 600 nm and M is the biofilm thickness  
199 (nm). The highest transparency values represent a lower biofilm transparency.  
200 For this analysis 10 random measurements of each repetition were made.

201 **2.3.4 Water Permeability (WVP)**

202 It was determined following gravimetric method ASTM E96-05 (ASTM,  
203 2005) water method. In aluminum cups of 6 cm diameter there were added 5 ml  
204 of distilled water and it was covered with the biofilms and put to a 25 °C  
205 temperature with relative humidity (HM) 100 % inside of the cup and 0% outside  
206 the cup. The loss of weight of cups was measured each hour during 9 h and the  
207 results were expressed in (g mm Pa<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>).

208

209 
$$WVP = \frac{GL}{At\Delta p} \quad (3)$$

210

211 Where G is the difference in cup weight (g) during the test, L is the thickness  
212 in (m<sup>2</sup>), A is the area of the sample used in the study, t, is the length the test  
213 lasted (s), and  $\Delta p$  is the pressures difference between the interior and exterior of  
214 the expressed cup. (Pa).

215 **2.3.5 Oxygen Permeability (OP)**

216 Measurements were made following method Figueroa-López et al., (2018).  
217 Where used a permeability analyzer to oxygen M8001 (Systech Illinois, Thame,  
218 Reino Unido) to 60% of HR and 23 °C and it was put a sample of (5 cm<sup>2</sup>) each  
219 biofilm in the test's cell. The samples were previously clear with nitrogen and  
220 were balanced of humidity before being exposed to a nitrogen flow of 10 mL ·  
221 min<sup>-1</sup>.

222 **2.3.6 Electronic microscopic scan (SEM)**

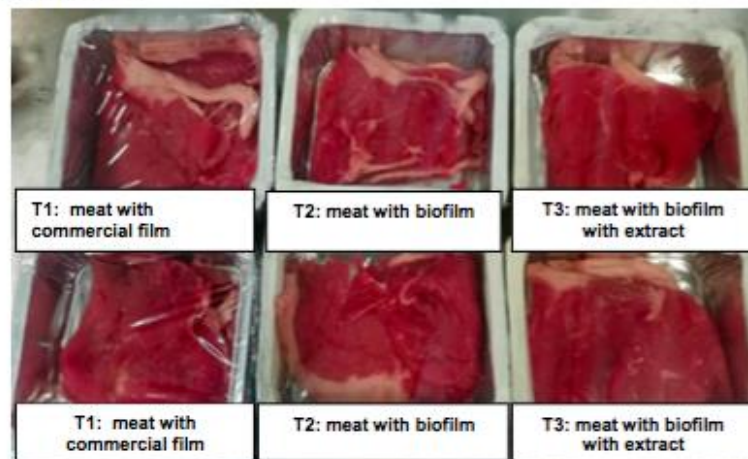
223 It was used an electronic microscope scan (JEOL Model 6510LV, Japan),  
224 there were obtained superficial pictures of samples in fragments of 4 x 4 mm to  
225 a working distance of 13 mm, using secondary electron signals (Figueroa-López  
226 et al., 2016; Andrade-Mahecha et al., 2012).

227 **2.3.7 Thermogravimetric test (TGA) and Differential calorimetric scan**  
228 **(DSC)**

229 An analyzer (SDT Q600 TA instruments, U.S.A) was used, with a  
230 temperature ranged between 25 to 600 °C with a velocity of 10 °C/min, using  
231 nitrogen as a purge's gas (Wang et al., 2017; Wang et al., 2015).

232 **2.4 Shelf life in beef meat.**

233 Analysis microbiological and color were made through bio factorial  
234 experimental design 4x5, using as a first factor, the treatments control: meat  
235 without biofilm, T1: meat with commercial biofilm brand Ziploc®, T2: meat with  
236 biofilm, T3: meat with biofilm using guava leave extract (Figure 3) and like second  
237 factor 5 lapse (0, 3, 6, 9, 12, 15) of 15 days in shelves' life. All the samples were  
238 done in triplicate.



239

**Figure 3. Shelf life treatments**

240

241 **2.4.1 Microbiological Analysis.**

242 To determine shelf life there were obtained samples of 100 g of meat  
243 (*Longissimus dorsi lumbar*) coming from "El rastro Municipal de Toluca, Estado  
244 de México"., which were put in aluminum tray 10 x 15 cm, previously sterilized.,  
245 which were recovered according to the experimental designed above mentioned.

246 A meat destructive method was used, where the samples were dispersed  
247 in a blender brand Oster model MXC/250-Oster. After that there were filtered with  
248 sterilized gauzes and there were made pertinent dilutions according to the NOM-  
249 110-SSA1-1994 standard.

#### 250 **2.4.1.1 Aerobic Mesophylls and Psychrophile**

251 To test the total amount of Aerobic Mesophylls (MA) and psychrophile was  
252 used the sum in plaque's technique, as it is established by NOM-092-SSA1-1994  
253 standard. All the dilutions of the samples were inoculated by triplicate in agar to  
254 standard sum. Incubating aerobic mesophylls to  $35\pm 2$  °C during  $48\pm 1$  h and  
255 psychrophiles to 4 °C during 5-10 days.

#### 256 **2.4.1.2 Total coliforms and fecal coliforms**

257 For the total amount of fecal coliforms (CF) was used (AFNOR) NF V08-60  
258 (1996) standard of French Association it was used to sum the fecal coliform's  
259 charge, it was planted by triplicate in Agar Bilis and Red Violet to a temperature  
260 of  $45\pm 2$  °C to  $48\pm 1$ h.

### 261 **2.4.2 Physical Analysis.**

#### 262 **2.4.2.1 Color**

263 The color was used a colorimeter Minoita brand, Osaka Japan, model  
264 Chromameter CR-400, which uses a light C,D65 and a system of lightning  
265 dim/angle of vision 0° trough CIELAB system, Lightness (L\*), Redness (a\*),  
266 Yellownees (b\*) following the technique described by (Ripoll et al., 2011).

## 267 **3 Results**

### 268 **3.1 Thickness and mechanical properties (resistance to tension, Young's** 269 **module)**

270 The results in Table 1, show that both biofilms have a thickness lower 0.1  
271 mm, do not showing meaningful differences (\* $P < 0.05$ ), suitable values according  
272 to standard method ASTM D882-02, to be able to be named plastic biofilms. On

273 the other hand, the obtained ranks to the resistance test to tension showed values  
 274 between (24.74 a 27.12 Mpa) finding meaningful difference between them  
 275 (\*P<0.05), having lower resistance to tension BCE., this effect could be explained  
 276 by the presence of micelles form the extract which are found distributed in all the  
 277 material as it is showed in the micrographics in Figure 5, and such distribution  
 278 affects the interaction among the gelatin-chitin molecules in the film's net,  
 279 generating links less steady and a major breakdown in a lower force presence.  
 280 In comparison to the literature reported values in this research are bigger than  
 281 the reported by Wang et al., (2007) which obtained a rank between (3.10 to 15.28  
 282 Mpa) in films made from protein and carbohydrates without mixture, but less to  
 283 the reported by (Wang et al, 2017) in a biofilm where was mixed starch-gelatin  
 284 (54.53 a 63.01 Mpa).

285 Regarding to elongation or Young's module, both biofilms (BSE and BCE)  
 286 show an elongation near to 47%. In relation to another researchers point, this  
 287 research's values are bigger in comparison to the one reported by Wang et al  
 288 (2017), where it is shown maximum values of 10% in biofilms from different  
 289 composition of starch-gelatin, but lower than the one reported by Wang et al.,  
 290 (2007) in some polymeric bases without mixture, such as sodium caseinate (62-  
 291 69 %), gelatin (89%) and potatoes' starch (55-71%) in different concentrations.

292 **Table 1. Show the results of the mechanic tests and biofilms thickness.**

Biofilm tested	Thickness (mm)	Tolerance Tension (Mpa)	Young's Module (%)
<b>BCE</b>	0.09±0.01	24.74±0.68b	47.20±2.70
<b>BSE</b>	0.08±0.10	27.12±0.68a	47.37±3.86
<b>SEM</b>	0.001	0.574	0.687
<b>P value</b>	0.0537	0.0263	0.9473

293 These values show the average ± standard deviation. The values with letters (a,  
 294 b) different in superscript inside the same column show the significant difference  
 295 (P <0.05), biofilm with extract (BCE), biofilm without extract (BSE).

296 **3.2 Optical Properties.**

297 In Table 2, it is shown the color results ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$   $\Delta E$ ), and transparency.  
 298 Both cases there is a significant difference ( $*P<0.05$ ) between BCE and BSE,  
 299 where the color value of the biofilms BSE was nearer to the white standard paper  
 300 ( $L^*=93.68$ ,  $a^*=1.93$ ,  $b^*=-1.87$ ), compared to BCE which are slightly different. The  
 301 values of  $L^*=90.7$  of BSE are more brilliant compared to the BCE:  $L^*=78.8$ .  
 302 Furthermore  $a^*$  and  $b^*$  of BSE are smaller than BCE, this shows that the last ones  
 303 present slightly coloration towards red and blue tones from the chromatic circle,  
 304 this is due to the coloration that generates plants pigments contained in the  
 305 extract and gives such a result a coloration brown-greyish as it is shown in Figure  
 306 1 and 2.

307 Related to the transparency value in Table 2, this is a quality of the bodies  
 308 to watch other objects through them, the two biofilms are transparent. However,  
 309 the BSE shows a higher transparency value (1.18) in comparison with the BCE's  
 310 transparency values. A transparent biofilm is suggested as favorable because it  
 311 allows to stand out the food's own characteristics to protect, but the color of the  
 312 meat could be affected by this effect in the shelf's life. As the light passed through,  
 313 it is produced a further degradation of myoglobin in the meat, this effect might be  
 314 reduced by the slight coloration presents in the BCE.

315 **Table 2. Shows the physical values in biofilms**

Biofilm Sample	Color's parameter				Transparency Values
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	
<b>BCE</b>	78.8±1.8a	2.4±0.3a	13.8±1.5b	19.1±3.7b	0.79±0.1a
<b>BSE</b>	90.7±0.2b	0.38±0.3b	7.53±1.4a	11.2±3.1a	1.18±0.1b
<b>SEM</b>	0.763	0.186	0.872	1.994	0.118
<b>P value</b>	0.0004	0.0004	0.0069	0.0497	0.0775

These values show the average  $\pm$  standard deviation. The values with letters (a, b) different in superscript inside the same column show the significant difference ( $P < 0.05$ ), luminosity ( $L^*$ ), red ( $a^*$ ), yellow ( $b^*$ ), difference in color  $\Delta E^*$ , biofilm with extract (BCE), biofilm without extract (BSE).



316 **3.3 Permeability property**

317 **3.3.1 Water vapor permeability**

318 The results are show in Table 3, where it is observed that there are not any  
319 significative differences (\*P<0.05) between the treatments. The above agrees  
320 with Giménez et al., (2013), who developed a gelatin biofilm added with green  
321 tea and where he did not find differences between the biofilm with extract addition  
322 and the biofilm without extract addition. On the other hand, Figueroa-López et al.,  
323 (2018) reported water vapor permeability in a grenetina-cellulose biofilm without  
324 extract of  $(4.76 \times 10^{-7} \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2^{-1})$  whereas that Avena- Bustillos  
325 reported values of  $(0.932- 1.884 \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2^{-1})$  in gelatin which comes  
326 from mammals or fish and they presented a higher water vapor permeability than  
327 the values previously reported in this investigation for both biofilms that goes in a  
328 range of  $(8.95 \text{ a } 9.29 \times 10^{-8} \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2^{-1})$ . Conversely, Váscquez et al.  
329 (2019) y Moura et al., (2015) in chitosan biofilms, the first one in combination with  
330 tapioca starch reported values of  $(2.8 \pm 0.3 \times 10^{-10} \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2^{-1})$  and the  
331 second one in a different molecular weight of chitosan reported  $(0.62- 1.27 \times 10^{-10}$   
332  $\text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{Pa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2^{-1})$  that it shows a greater barrier against the water vapor.  
333 It can explain because of the chitosan has greatest barriers properties against  
334 the water vapor than the gelatin. The biofilms from this investigation are made of  
335 gelatin- chitosan, in consequence, it suggests that its barriers properties against  
336 the water vapor are combined and as a result they give medium values to the  
337 reported by the previous mentioned authors. Referring to the BCE, it did not  
338 improve the barrier properties against the water vapor as opposed to what others  
339 authors report which decrease the biofilms permeability when adding essential  
340 oils from plants (Martucci et al., 2015; Pelissari et al., 2010).

341 **3.3.2 Oxygen permeability**

342 The results are shown in Table 3, where it is observed that there are not  
343 any significative differences between the treatments (\*P<0.05), referring to the  
344 values that were find in this investigation, they are in a range of  $9.7 \text{ a } 9.10 \times 10^{-18}$   
345  $\text{ m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ , these present a greatest barrier oxygen than the reported  
346 by Figueroa-López et al., (2018), who report values of  $(13.8 \pm 1.7 \times 10^{-15} \text{ m}^3$

347  $\cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ) in a gelatin biofilm and the reported by Ortega-Toro et al., (2015) in  
 348 a starch biofilm ( $23 \pm 1.7 \times 10^{-15} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ). This starch biofilm was  
 349 reported as an excellent for packaging in meat foods in the barrier against oxygen  
 350 matter. This effect maybe due to the improvement of the barrier properties when  
 351 combining gelatin with chitosan more when it is used by separated.

352 **Table 3. Oxygen permeability and water permeability values**

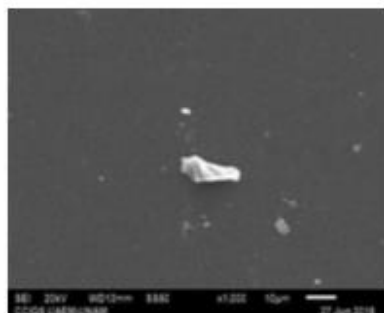
Biofilm evaluated	Water vapor permeability ( $\text{g} \cdot \text{mm} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	Oxygen permeability ( $\text{m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ )
<b>BSE</b>	$9.29 \pm 1.09 \times 10^{-18}$	$9.7 \pm 3.5 \times 10^{-18a}$
<b>BCE</b>	$8.95 \pm 1.06 \times 10^{-8}$	$9.10 \pm 0.97 \times 10^{-18a}$
<b>SEM</b>	$5.19 \times 10^{-9}$	$1.07 \times 10^{-18}$
<b>P value</b>	0.6587	0.6996

The values expressed the standard deviation  $\pm$  measure. The values in letters (a,b) different in the superscripts inside of the same column shows a significant difference ( $P < 0.05$ ) biofilm with extract (BCE), biofilm without extract (BSE)

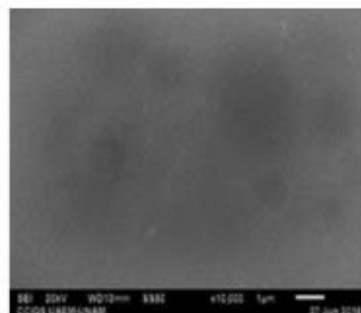
### 353 **3.4 Biofilms' Morphology**

354 The surface's morphology of the BCE and BSE derivative from this  
 355 investigation have been investigated by SEM and these are shown in the Figure  
 356 4 (A y B) and Figure 5 (A y B). In these images, it is observed the smooth surface  
 357 with a high miscibility of materials except for some chitosan particles and which  
 358 failed to solubilize. This effect did not have influence in the biofilms' morphology  
 359 by not presenting porosity, roughness or fractures in its structure. In Figure 5.  
 360 The BCE is presented, it shows circular dark spots known as micelles. The  
 361 micelles refer to fractions of hydrophobic compounds contained in the extract that  
 362 are shown distributed throughout the surface area of the bioplastic. This is an  
 363 important characteristic because the extract added is the one who presents the  
 364 antimicrobial or antioxidant effect that can migrate the material when it is in  
 365 contact with the product to protect.

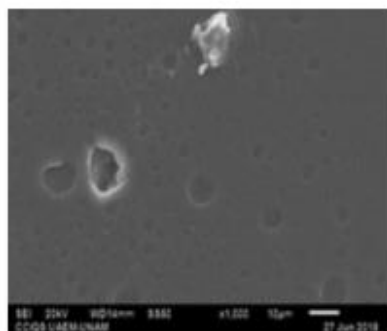
366



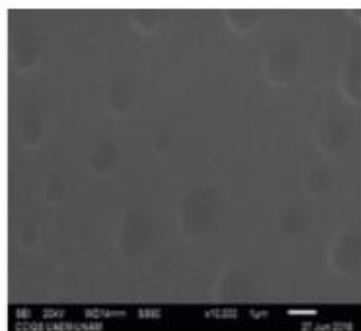
367  
368  
369  
370  
**Figure 4 (A)** Micrography  
Biofilm without extract (BSE)  
10 μm



**Figure 4 (B)** Micrography  
Biofilm without extract (BSE)  
to 1 μm



371  
**Figure 5 (A)** Micrography  
Biofilm without guava extract  
(BSE) 10 μm



**Figure 5 (B)** Micrography<sup>372</sup>  
Biofilm without guava extract<sup>373</sup>  
(BSE) to 1 μm 374

375 **3.5 Thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning**  
376 **calorimetry (DSC)**

377 The thermogravimetric analysis results were shown in the Figure 6. (BSE)  
378 and Figure 7 (BCE) in both figures, it is clearly presented four changes with the  
379 temperature and the mass. The first one was about the 100 °C, with weight loss  
380 of 8.11 % and 9.58 % (BCE and BSE respectively) it suggests that is related with  
381 the water weight loss of the samples. The second change occurred between 230  
382 °C and 250 °C registering a weight loss of 34.10 and 35.19% (BCE and BSE  
383 respectively), it suggests that the values correspond to the weight loss of low  
384 molecular proteins constituted in the gelatin and also to the plasticizer  
385 components (glycerol). The third phase was registered around of 400 °C and it

386 shows a weight loss of 31.15 to 28.80 (BCE and BSE respectively), and that was  
 387 because of the carbohydrates loss presents in the polymer (chitosan). At the end,  
 388 in the fourth phase, which was around 500-510 °C, there was a loss about 25%  
 389 for both biofilms, it was due to the degradation of high molecular weight proteins  
 390 and carbohydrates, as well as the non-volatile phase of Tween 80.

391 About the DSC results, Hosseini et al., (2013), indicates the melting point  
 392 for gelatin is 29.8 °C and the melting point of biofilms with chitosan is 56.1 °C.,  
 393 Those are smaller values than the results found in BSE which are of 75 °C., And  
 394 it suggests that was because of the interaction. The interaction improves the  
 395 thermal characteristics as there is a better molecular interaction that increases  
 396 miscibility and with that, new hydrogen bonding networks. Conversely, BCE does  
 397 not show a normal behavior of thermoplastics not finding a difference in the fusion  
 398 phase, which is observed in the Figure 6. What has been observed previously, it  
 399 is suggested that by adding the hydroalcoholic extract to the biofilms they become  
 400 thermostable, which can be due to the fact that hydrophobic compounds hinder  
 401 the interaction between gelatin-chitosan molecules in the network of the film.

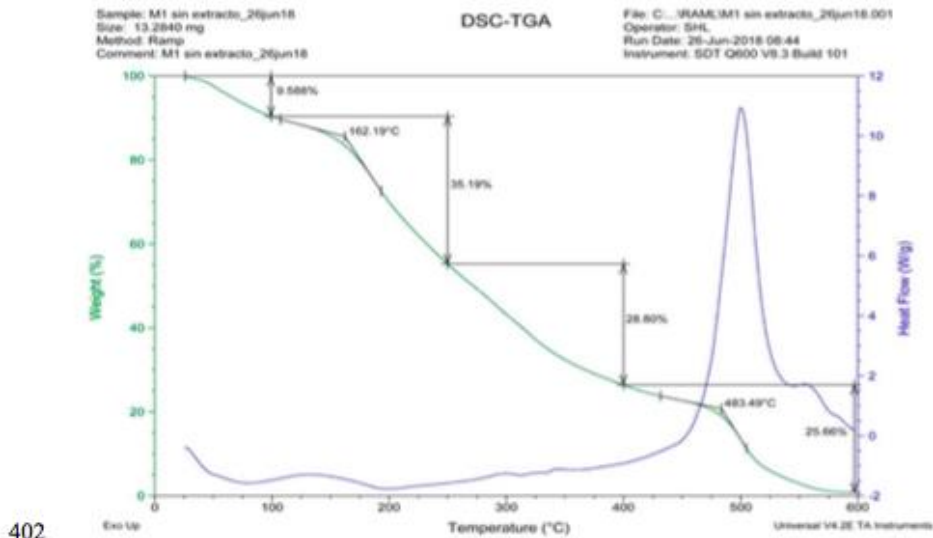
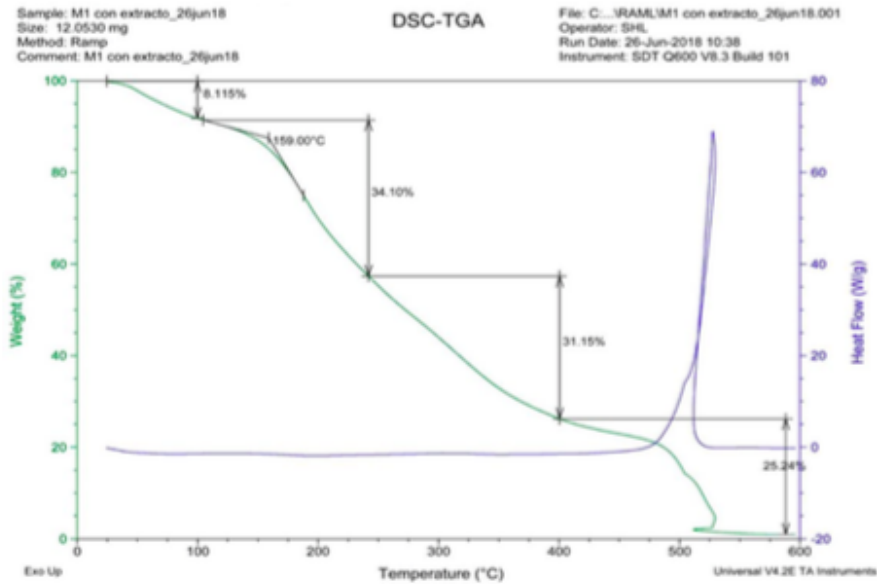


Figure 6. Biofilm micrograph without extract



**Figure 7.** Biofilm micrograph with guava leaf extract

404 **3.6 Shelf life results**

405 **3.6.1 Microbiologic analysis**

406 The results for a useful life was analyzed through a multifactorial Analysis  
 407 of variance (ANOVA), finding a significant difference ( $*P < 0.05$ ). It has been made  
 408 a means Tukey test to the 95% and the results are in Table 4 and Table 5.

409 As it is observed in Table 4, there are any significant difference ( $*P < 0.05$ )  
 410 between treatments (T1, T2, T3 y T4) on day 0 to the microorganisms MA (4.06  
 411 a 4.25 UFC/ml), CT (3.74 a 3.90 UFC/ml) y PS (2.65 a 3.01 UFC/ml) the microbial  
 412 is the same as at the beginning of the experiment. Because of the witness does  
 413 not have a protective film only its shelf life was determined until day nine because  
 414 it presented a cold damage which affects its physicochemical characteristics and  
 415 with this it was determine the end of its shelf life. By the contrary, the (T1, T2 y  
 416 T3) were determine the end of his shelf life on day 15.

417 **3.6.1.1 Aerobic mesophiles**

418 On days 3 and 6, they show a similar behavior and presenting a significant  
419 difference ( $*P<0.05$ ) between treatments. The results, about quantification  
420 UFC/m in the different treatments, are presented in Table 4. This designate that  
421 it was qualification higher values in the witness and in the T1, it suggests an  
422 inhibition of Ma by the effect of the components of the biofilms, in special for T1  
423 and T2, which contains in his structure chitosan. Chitosan is a component that  
424 has antimicrobial and antifungal properties (Aider, 2010). Added to this, the T3  
425 presents a higher inhibition as the results was designated and suggests that is  
426 because of the additional component; the hydroalcoholic extract of guava leaf.

427 On the day 9, the treatment with a lower quantification returns to be T3 in  
428 comparison with the witness, which presents the greatest proliferations. It is worth  
429 mentioning that T1 and T2 does not present a significant difference ( $*P<0.05$ ) yet,  
430 between them therefore, it is suggested that the chitosan inhibitory effect reaches  
431 its greatest inhibition in the time span from day 6 to day 9.

432 The results of the day 12 shows a significant difference ( $*P<0.05$ ) between  
433 treatments. However, the behavior of the treatments was as expected, showing  
434 the T3 with a lowest quantification and the T1 with the highest quantification. The  
435 witness treatment, this day, presents a refrigeration burn (Effect where meat  
436 loses water and with it the decrease presence of microorganisms).

437 The results on the day 15, they did not present differences between  
438 treatments ( $*P<0.05$ ). However, at this point the sensory, and the  
439 physicochemical characteristics becomes unacceptable for human consumption  
440 giving a guideline at the end of its useful life.

441 **3.6.1.2 Total coliform and fecal coliform**

442 As for the results of fecal coliform, they are not shown because there was  
443 no presence of these microorganisms in the meat at least the first days of shelf  
444 life.

445 For total coliform, the results of the day 3 shows a behavior very similar to  
446 the aerobic mesophiles as they are indicated in the Table 4, a significant  
447 difference (\*P<0.05) being the T3 which has the greatest antimicrobial effect  
448 throughout the 15 days of shelf life.

449 Finally, it is worth mentioning that the T2 and T3, in the aerobic mesophiles  
450 and total coliform variables there is a significant effect (\*P<0.05) related to the  
451 quantifications per day. It is interesting to show in the day 3, that the values from  
452 UFC under below day 0 counts that is the initial product load. The above suggests  
453 that the antimicrobial and antifungal effect is related on the one hand by the  
454 presence of chitosan in the composition of the films and on the other by the  
455 presence of the guava leaf extract, with the latter component having the lowest  
456 microbial proliferation, showing this effect.

457 Only for a period of time, at the end of the 15 days evaluated the results are  
458 similar between treatments and the witness. However, it is a beneficial effect  
459 when taking into account that meat is a perishable food and its occupation life in  
460 supermarkets is limited, where the effect of the biofilm with guava leaf extract can  
461 maintain the safety of the product due to the antimicrobial bioactive properties  
462 which is presented as reported in a previous work (Archundia et al., 2019).

### 463 **3.6.1.3 Psychrophiles**

464 The results are show in the Table 4, in a similar way to the previous  
465 microorganisms related to the 15 days of shelf life evaluated mostly the T3, it  
466 shows the lowest proliferations in comparison with the witness, T1, and T2,  
467 corroborating the antimicrobial and antifungal effect of the guava leaf extract  
468 shown above.

469

470

471

472

**Table 4. Microbiological analysis in shelf's life of meat with biofilm and without biofilm during the first 15 days**

	Treatments				<i>P</i>
	Control	T1	T2	T3	
Aerobic Mesophiles (log <sub>10</sub> UFC/ml)					
0	4.25±0.3aA	4.13±0.1baA	4.17±0.1aB	4.06±0.5aB	0.5125
3	4.62±0.05cB	4.51±0.04cAB	3.59±0.07bA	3.07±0.3aA	0.0001
6	4.64±0.16cB	4.58±0.02cB	4.36±0.13bB	3.87±0.1aB	0.0000
9	5.47±0.24cC	5.20±0.20abB	5.34±0.04bC	5.08±0.12aC	0.0030
12	-	5.58±0.02cD	5.40±0.03bC	5.08±0.04aC	0.0000
15	-	5.31±0.05aC	5.19±0.21aC	5.04±0.27aC	0.1702
<i>P</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
Total Coliforms (log <sub>10</sub> UFC/ml)					
0	3.57±0.13aA	3.90±0.17aA	3.74±0.20abB	3.87±0.15aB	0.5036
3	4.44±0.03cB	3.75±0.21bA	2.73±0.30aA	2.35±0.62aA	0.0004
6	4.84±0.06cC	4.56±0.06bB	4.54±0.05bC	3.6±0.06aB	0.0000
9	5.38±12cD	4.75±0.06bB	4.80±0.02bCD	4.34±0.14aBC	0.0002
12	-	4.69±0.05bB	4.84±0.15bCD	4.67±0.03aC	0.0028
15	-	5.33±0.02bC	5.02±0.04abD	4.77±0.07aC	0.0000
<i>P</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
Psychrophiles (log <sub>10</sub> UFC/ml)					
0	3.01±0.7aA	2.65±0.52aA	2.65±0.52aA	2.69±0.32aA	0.8192
3	5.30±0.17bB	5.57±0.38cB	5.42±0.03bcB	4.90±0.23aB	0.0297
6	5.59±0.06aBC	5.88±0.02bB	5.9±0.02bC	5.69±0.09aAB	0.0005
9	5.97±0.12aABC	6.63±0.10cCD	6.5±0.12cC	6.3±0.02bCD	0.0004
12	-	7.17±0.02bCD	7.3±0.09bD	6.9±0.01aDE	0.0000
15	-	7.82±0.15bD	8.1±0.18bE	7.39±0.01aE	0.0000
<i>P</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	

Lowercase letters (abcd) show significant difference between rows, uppercase letters (ABC) show significant difference between columns, colony forming units (UFC), Commercial film (T1), gelatin-chitosan biofilm (T2), Gelatin-chitosan biofilm with extract guava leaf (T3), *P* (\**P* <0.05).



473 **3.6.2 Physical Analysis**

474 **3.6.2.1 Color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ )**

475 The results of the variables are show in the Table 5. Related to the initial  
476 day of the experiment it does not show significant differences ( $*P<0.05$ ) between  
477 treatments, so the treatments start with the same characteristics of the meat.

478 Related to the lightness variable ( $L^*$ ) in the days 3, 6, 9, 12, and 15 of the  
479 useful life, there were significant differences ( $*P<0.05$ ), forming two groups: in the  
480 first one, it is the witness and the T1; they tend to be darker than the second  
481 group; which are T2 and T3, they are brighter than the others. The same trend is  
482 observed in the color variable ( $a^*$ ), in that, the shelf life period of T1 and T3 shows  
483 a lower degradation of pigments than the witness and the T1. It is worth to  
484 mentioning that he T3 shows more stable red values because it suffered a lower  
485 degradation of pigments.

486 About the color variable ( $b^*$ ), in the Table 5. It is observed that for all the  
487 treatments from the day 0 to the day 9, there are not significant difference  
488 ( $*P<0.05$ ) between treatments. However, in the days 12 and 15, there is a  
489 noticeable significant difference, being the T3 which obtained the higher values  
490 with a tendency to yellow, by the contrary, if there were colorations with a  
491 tendency towards green, it means that the meat would present a greater rot.

492 Finally, the effect on coloring is proposed can be explained because of the  
493 myoglobin degradation and the oxidation of fats from meat that is generated in  
494 the control (without commercial film) and the T1 (commercial film) in comparison  
495 with T2 (gelatin-chitosan biofilm) and the T3 (gelatin-chitosan biofilm with extract)  
496 this effect could be given because of the chitosan which it is formed the biofilms  
497 that presents antioxidant activity (Ngo and Kim, 2014) and the reported by  
498 Archundia et al., (2019) that indicates antioxidant activity in the guava extract,  
499 same one that was worked in the biofilm's elaboration of T3. This explication can  
500 help to understand the decrease in the oxidation of fat and myoglobin in the meat  
501 by the antioxidant effect, resulting in more stable colorations in this treatment.

502

**Table 5. Color analysis in shelf's life of meat with biofilm and without biofilm**

	Treatments				<i>P</i>
	control	T1	T2	T3	
Lightness (L*)					
0	40.22±1.95aD	39.53±0.64aE	40.13±0.60aC	38.64±0.62aD	0.3457
3	34.11±0.59aC	32.23±1.49aD	39.58±1.45bBC	36.28±1.29bD	0.0028
6	26.53±0.74aB	27.91±0.22bC	35.54±2.41dB	31.26±0.73cC	0.0003
9	22.70±0.78aA	25.83±0.88bB	29.44±0.57cA	31.20±0.56cBC	0.0000
12	-	24.72±0.4aB	29.07±0.60bA	30.04±0.68bB	0.0000
15	-	22.89±0.34aA	28.84±0.40bA	27.77±1.01bA	0.0000
<i>P</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0318	
Redness (a*)					
0	26.07±2.47aC	23.50±0.51aF	24.46±0.7abF	25.7±0.53bcD	0.4508
3	20.98±2.26aB	19.27±1.01aE	21.61±0.24aE	21.11±1.66aC	0.0525
6	13.46±1.12aA	15.51±1.17abD	16.89±0.63bD	20.02±0.8cC	0.0001
9	12.58±1.65aA	12.27±0.75aC	15.26±0.54bC	16.86±0.81cB	0.0134
12	-	6.01±1.64aB	14.13±0.07bB	14.85±0.08cA	0.0001
15	-	3.36±0.47aA	8.90±1.37bA	14.05±0.7cA	0.0000
<i>P</i>	0.0001	0.0001	0.0003	0.0001	
Yellowness (b*)					
0	20.20±0.17°C	19.21±1.51aE	17.52±0.33aE	19.42±2.34aC	0.2045
3	19.93±2.64aB	17.28±1.16aE	16.51±1.75aE	18.15±0.24aC	0.1502
6	12.58±2.03 <sup>a</sup> A	15.04±0.60aD	11.86±1.11aC	13.65±1.47aB	0.1012
9	11.37±1.36aA	11.8±0.67aC	11.50±0.07aC	11.63±2.21aAB	0.9280
12	-	9.89±0.64aB	9.22±0.63aB	10.8±0.4cA	0.0318
15	-	7.53±0.49aA	7.78±1.1aA	9.98±0.69bA	0.0303
<i>P</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	

Lowercase letters (abcd) show significant difference between rows, uppercase letters (ABC) show significant difference between columns, colony forming units (UFC), Commercial film (T1), Gelatin-chitosan biofilm (T2), Gelatin-chitosan biofilm with extract guava leaf (T3), *P* (\**P* < 0.05).

#### 503 4 Conclusions

504 In this study, gelatin-chitosan biofilm with and without guava leaf extract were  
505 developed and characterized which generally show good plastic properties. As  
506 for the effect that caused the addition of the extract, it is observed that it does not  
507 affect the thickness properties, elongation, Young's modulus, water vapor  
508 permeability and to the oxygen, as well as morphology, or its thermal properties  
509 such as TGA and DSC., because they are similar to biofilms without extract, In  
510 contrast to this, the addition of the extract showed significant difference (\*P <0.05)  
511 in tensile strength, where there is a decrease in this value, as well as a visible  
512 effect on the SEM images of the presence and homogeneous distribution of the  
513 extract's micelles and which are suggested to give it to biofilms a beneficial  
514 bioactive effect on the shelf's life of beef while maintaining the safety and  
515 physicochemical characteristics of meat for a long period of time.

#### 516 5 References

- 517 AFNOR, 1996. Microbiology of food and animal feedings stuffs. Enumeration of  
518 thermotolerant coliforms by colony-count technique at 44°C, routine method.  
519 Association Française de Normalisation, Paris, France.
- 520 Ahmad, M., Hani, N. M., Nirmal, N. P., Fazial, F. F., Mohtar, N. F., & Romli, S. R.  
521 (2015). Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish  
522 gelatin/rice flour fabricated by casting technique. *Progress in Organic Coatings*, 84,  
523 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.02.016>
- 524 Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential  
525 in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 837–842.  
526 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.021>
- 527 Aider, Mohammed. (2010). Chitosan application for active bio-based films production  
528 and potential in the food industry: Review. *Food Science and Technology* 43 (2010)  
529 837–842.
- 530 Andrade-Mahecha, M. M., D.R. Tapia-Blácido y F.C. Menegalli. (2012). Development  
531 and optimization of biodegradable film based on achira flour. *Carbohydr. Polym.*  
532 88(2), 449–458. Doi: 10.1016/j.carbpol.2011.12.024
- 533 Archundia Velarde, E. D., Pinzón Martínez, D. L., Salem, A. Z. M., Mendoza García, P.  
534 G., & Mariezcurrena Berasain, M. D. (2019). Antioxidant and antimicrobial capacity  
535 of three agroindustrial residues as animal feeds. *Agroforestry Systems*.  
536 <https://doi.org/10.1007/s10457-018-00343-7>

- 537 Arfat, Y. A., Ahmed, J., Hiremath N., Auras, R., Joseph, A. (2014). Thermo-mechanical,  
538 rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based  
539 on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. *Food Hydrocolloids* 39, 58-67.  
540 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.009>
- 541 ASTM International. (2005). *Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of*  
542 *Materials, E 96/E 96M - 05. I*, 1-8.
- 543 ASTM. (2002). Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting.  
544 Designation: D 882 - 02. *Annual Book of ASTM Standards*, 1-10.  
545 <https://doi.org/10.1520/E0096>
- 546 Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Olson, D. A., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., &  
547 McHugh, T. H. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin  
548 films. *Journal of Food Science*, 71(4), 202-207. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00016.x>
- 550 Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based  
551 films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136-148.  
552 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- 553 Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A  
554 review. *Materials Science and Engineering C*, 33(4), 1819-1841.  
555 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- 556 Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A. y Ibarz, A. (2011). Edible films  
557 and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food*  
558 *Science & Technology*, 22 (6) 292-303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- 559 Figueroa-Lopez, K. J., Andrade-Mahecha, M. M., & Torres-Vargas, O. L. (2018).  
560 Development of antimicrobial biocomposite films to preserve the quality of bread.  
561 *Molecules*, 23(1), 1-18. <https://doi.org/10.3390/molecules23010212>
- 562 Figueroa-Lopez, K. J., Castro-Mayorga, J. L., Andrade-Mahecha, M. M., Cabedo, L., &  
563 Lagaron, J. M. (2018). Antibacterial and barrier properties of gelatin coated by  
564 electrospun polycaprolactone ultrathin fibers containing black pepper oleoresin of  
565 interest in active food biopackaging applications. *Nanomaterials*, 8(4).  
566 <https://doi.org/10.3390/nano8040199>
- 567 Figueroa-López, K., García-Salcedo, A. J., Torres-Vargas, O Ariza-calderón, O. L. T. H.  
568 (2016). *Efecto de PVA y pimienta negra en las propiedades estructurales de*  
569 *películas de gelatina Effect of PVA and black pepper in the structural properties of*  
570 *gelatin films*. 34, 156-160. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58220>
- 571 García-Argueta, I., Dublán-García, O., Quintero-Salazar, B., Dominguez-Lopez, A.,  
572 Gómez-Oliván, L.M. y Abdel-Fattah Z. M. S. (2013). Effect of lactic acid bacteria  
573 on the textural properties of an edible film based on whey, inulin and gelatin, *African*  
574 *Journal of Biotechnology*. 12(19), 2659-2669. DOI: 10.5897/AJB2013.12134

- 575 García-Díaz, G. y Macías-Matos, C. (2008). Temas de Higiene de los alimentos. In A.  
576 Caballero (Ed.), Peligros toxicológicos de los envases plásticos. (Capítulo 11, pp.  
577 154). *Ciencias médicas La Habana* (Cuba).
- 578 Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M.E., Montero, P.  
579 (2013). Release of active compounds from agar and agar gelatin films with green tea  
580 extract. *Food Hydrocolloids*, 30 (2013) 264-271.  
581 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.014>
- 582 Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011).  
583 Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources:  
584 A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.  
585 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- 586 Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E.,  
587 Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for  
588 developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*,  
589 20(1), 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- 590 Honikel, K.O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of  
591 meat. *Meat Science* 49 (4). pp. 447-457.
- 592 Mariod, A. A., & Adam, H. F. (2013). Review: Gelatin, source, extraction and industrial  
593 applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 12(2), 135-  
594 147.
- 595 Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M., & Ruseckaite, R. A. (2015). Oregano and  
596 lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin  
597 films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205-213.  
598 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.079>
- 599 Martucci, J. F., Gende, L. B., Neira, L. M., & Ruseckaite, R. A. (2015). Oregano and  
600 lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin  
601 films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205-213.  
602 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.079>
- 603 Moura, J. M., Farias, B. S., Rodrigues, D. A. S., Moura, C. M., Dotto, G. L., & Pinto, L.  
604 A. A. (2015). Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its  
605 Application for Biofilms Production. *Journal of Polymers and the Environment*,  
606 23(4), 470-477. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0730-y>
- 607 Nerín de la Puerta, C. (2009). Seguridad alimentaria en materiales en contacto con los  
608 alimentos. En: Seguridad alimentaria e higiene de los alimentos (pp. 127-146).  
609 Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud.
- 610 Ngo, D. H., & Kim, S. K. (2014). Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their  
611 derivatives. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 73).  
612 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>

- 613 NOM-092-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios. Método para  
614 la cuenta de bacterias aerobias en placa. NOM-092-SSA1-1994. SSA. México, D.F.,  
615 Diario Oficial de la Federación. 8 pp.
- 616 NOM-110-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios, Preparación  
617 y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Diario  
618 Oficial de la Federación, México D.F., México
- 619 NOM-113-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios, Método para  
620 la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la  
621 Federación, México D.F., México.
- 622 Nur Hanani, Z. A., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2014). Use and application of gelatin as  
623 potential biodegradable packaging materials for food products. *International*  
624 *Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94–102.  
625 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.027>
- 626 Park, S. I. L., Marsh, K. S., & Dawson, P. (2010). Application of chitosan-incorporated  
627 LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. *Meat Science*, 85(3),  
628 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.02.022>
- 629 Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pined, E. A. G. (2009).  
630 Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films  
631 incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food*  
632 *Chemistry*, 57(16), 7499–7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>
- 633 Ramos, M., Valdés, A., Beltrán, A. y Garrigós, M. C. (2016). Gelatin-Based Films and  
634 Coatings for Food Packaging Applications *Coatings*, 6 (4) 41. Doi:  
635 10.3390/coatings6040041
- 636 Ripoll, G., Joy, M., and Muñoz, F. (2011). Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to  
637 increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. *Meat*  
638 *Science*, 542 87, 88–93. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.09.008>
- 639 Sadaka, F., Nguimjeu, C., Brachais, C.H., Vroman, I., Tighzert, L., Couvercelle, J.P.  
640 (2014). Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active  
641 biomolecules. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol*, 20, 350–355.  
642 <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.03.002>
- 643 Sánchez, D., Contreras-Esquivel, J.C., Nevárez-Moorillón, G.V. y Aguilar C.N.  
644 (2015). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y  
645 aceite esencial de limón Mexicano, *Journal of Food*, 13 (1) 17–25 pp  
646 <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2014.904929>
- 647 Seixas, F. L., Turbiani, F. R. B., Salomão, P. G., Souza, R. P., & Gimenes, M. L. (2013).  
648 Biofilms composed of alginate and pectin: Effect of concentration of crosslinker and  
649 plasticizer agents. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1693–1698.  
650 <https://doi.org/10.3303/CET1332283>

- 651 Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C. J., and Wess, T. (2004).  
652 Molecular interactions in collagen and chitosan blends, *Biomaterials* 25 (5) 795-801.  
653 [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00595-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00595-7)
- 654 Valdés, A., Mellinas, A. C., Ramos, M., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M. C.  
655 (2015). Use of herbs, spices and their bioactive compounds in active food packaging.  
656 *RSC Advances*, 5(50), 40324–40335. <https://doi.org/10.1039/c4ra17286h>
- 657 Valenzuela V., C., & Arias, J. I. (2012). Potenciales aplicaciones de películas de  
658 quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances En Ciencias*  
659 *Veterinarias*, 27(1), 33–47. <https://doi.org/10.5354/0716-260x.2012.21997>
- 660 Wang L.F, Rhim, J. W. (2015). Preparation and application of agar/alginate/collagen  
661 ternary blend functional food packaging films *International Journal of Biological*  
662 *Macromolecules* 80 (2015) 460–468
- 663 Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2015). Preparation and application of agar/alginate/collagen  
664 ternary blend functional food packaging films. *International Journal of Biological*  
665 *Macromolecules*, 80, 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.007>
- 666 Wang, W., Wang, K., Xiao, J., Liu, Y., Zhao, Y., & Liu, A. (2017). Performance of high  
667 amylose starch-composited gelatin films influenced by gelatinization and  
668 concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 258–265.  
669 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.014>
- 670 Yan, Q., Hou, H., Guo, P. and Dong, H. Effects of extrusion and glycerol content on  
671 properties of oxidized and acetylated corn starch-based films. *Carbohydrate.*  
672 *Polymers*, 87, 707–712. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.048>
- 673