

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



## **TESIS**

**“Desarrollo de películas plásticas a base de biopolímeros”**

Que para obtener el grado de:

***Doctora en Ingeniería***

Presenta:

***Ivone Michel Wong Miramontes***

Director:

***Dr. Benjamín Valdez Salas***

Co-Director:

***Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida***

***Mexicali, Baja California***

***Agosto de 2024***

## DEDICATORIA

*A mis niños,  
que son mi vida, mi alma y corazón,  
que sin ellos mi vida no sería igual,  
son mi mayor inspiración,  
y motivo para seguir adelante,  
**los amo Iker y Arantza.***

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Celia que me ha apoyado siempre, y que a pesar de todo siempre estuvo ahí cuando la necesite.

A mi pareja, que se siente orgulloso de mi por todo lo que he logrado, que me ha apoyado siempre, que nunca ha dudado de mi capacidad de lograr las cosas, y que me alienta y acompaña aun cuando estamos a la distancia, Gracias Fernando Marín.

A mi director de tesis, a quien admiro y respeto, que es la persona que me dio la oportunidad de estar en el posgrado, quien confió en mí, quien me enseñó que una puede hacer las cosas que se propone a pesar de las adversidades que tiene, gracias Dr. Benjamín Valdez.

A mis compañeros de laboratorio, por ayudarme a aprender en este nuevo desafío llamado ciencia, que me enseñaron y me tuvieron paciencia y por ofrecerme su linda amistad. Gracias Jorge Salvador y Karen Guillen.

Al Instituto de Ingeniería de la UABC por abrirme las puertas, darme mi segundo hogar durante 4 años.

Al Dr. Vladimir Escobar por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en el Laboratorio de polímeros avanzados en el IPICYT, en S.L.P. Dándome total confianza en mi estadía allá.

A los investigadores que me auxiliaron en el avance de mi proyecto: M.I. Alejandra Muñoz en FURUKAWA, Dr. Tito Herrera, Dr. Ernesto Beltrán, Dr. Mario Curiel, Dr. Jhonathan Castillo y Dr. Oscar Pérez.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por su apoyo económico para el desarrollo de mi proyecto de doctorado.

Y finalmente a MI MISMA, por todo el esfuerzo, dedicación, trabajo y tiempo invertido, que a pesar de las dudas que tuve pude lograr este objetivo sin nunca rendirme.

***“No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo, correr los escombros y destapar el cielo.”***

**\*Mario Benedetti**

# INDICE

---

<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1. Introducción.....	19
1.2 Planteamiento del problema .....	20
1.3 Justificación .....	20
1.4 Objetivo General .....	21
1.5 Objetivos específicos .....	21
1.6 Hipótesis .....	22
<b>CAPITULO 2: ANTECEDENTES</b> .....	23
<b>CAPITULO 3: MARCO TEÓRICO</b> .....	25
3.1 Polímeros.....	25
3.2 Biopolímeros .....	25
3.2.1 Biopolímeros obtenidos de biomasa: Polisacáridos.....	26
3.3 Quitina y Quitosano .....	27
3.3.1 Reseña Histórica.....	27
3.3.2 Definición .....	29
3.3.3 Fuentes de quitina y quitosano .....	30
3.3.4 Especie <i>Farfantepenaeus Californiensis</i> .....	30
3.4 Método de extracción de quitina y quitosano .....	31
3.4.1 Acondicionamiento de la Materia Prima .....	32
3.4.2 Extracción Química de quitina .....	32
3.4.3 Extracción de quitosano .....	33
3.5 Métodos de caracterización de quitosano.....	34
3.5.1 Contenido de Cenizas .....	34
3.5.2 Rendimiento Total .....	35
3.5.3 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	35
3.5.4 Grado de Desacetilación.....	37
3.5.5 Grado N-Acetilación .....	37
3.5.6 Viscosidad.....	38
3.5.7 Caracterización por Viscosimetría Capilar .....	39
3.5.8 Peso molecular .....	39
3.5.9 Análisis térmico: Calorimetría diferencial de Barrido (DSC) .....	40

3.5.10	<b>Análisis termogravimétrico (TGA)</b> .....	42
3.6	<b>Nanomateriales</b> .....	44
3.6.1	<b>Tipos de nanomateriales</b> .....	46
3.7	<b>Síntesis de nanopartículas</b> .....	49
3.8	<b>Técnicas de caracterización de nanopartículas</b> .....	50
3.8.1	<b>Dispersión Dinámica de Luz (DLS)</b> .....	50
3.8.2	<b>Espectrómetro de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDS)</b> .....	52
3.8.3	<b>Espectroscopia infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)</b> .....	52
3.8.4	<b>Espectroscopia UV-Vis</b> .....	53
3.8.5	<b>Microscopia electrónica de barrido (SEM)</b> .....	54
3.8.6	<b>Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)</b> .....	54
3.8.7	<b>Análisis microbiológico</b> .....	55
3.9	<b>Síntesis verde de nanopartículas</b> .....	56
3.9.1	<b>El uso de plantas para la síntesis de nanopartículas</b> .....	56
3.10	<b>La planta <i>Pluchea Sericea</i> (Cachanilla)</b> .....	57
3.11	<b>Metabolitos secundarios y sus propiedades biológicas</b> .....	58
3.11.1	<b>Extracción y caracterización de metabolitos secundarios</b> .....	60
3.11.2	<b>Métodos de extracción y separación</b> .....	60
3.11.3	<b>Análisis cualitativo (Barrido fitoquímico)</b> .....	62
3.12	<b>Selenio</b> .....	63
3.12.1	<b>Síntesis verde de nanopartículas de selenio</b> .....	64
3.13	<b>Empaque alimenticio</b> .....	64
3.14	<b>Biopolímeros utilizados en empaque alimenticio</b> .....	65
3.15	<b>Películas plásticas y recubrimientos alimenticios</b> .....	67
3.15.1	<b>Propiedades y características de las películas activas y recubrimientos para empaque de alimentos</b> .....	68
3.15.2	<b>Elaboración de películas plásticas y recubrimientos</b> .....	69
3.16	<b>Caracterización de películas plásticas a base de biopolímeros</b> .....	72
3.16.1	<b>Espesor de las películas plásticas</b> .....	73
3.16.2	<b>Densidad aparente</b> .....	73
3.16.3	<b>Contenido de humedad (MC), absorción de agua o grado de hinchabilidad (SP) y solubilidad (S)</b> .....	74
3.16.4	<b>Transparencia/Opacidad</b> .....	75

3.16.5	Análisis Térmico .....	76
3.16.6	Pruebas mecánicas .....	77
3.16.7	Actividad Antimicrobiana.....	78
3.16.8	Biodegradabilidad de las películas en el suelo.....	79
3.16.9	Habilidad potencial de las películas plásticas a base de biopolímeros en aplicaciones en frutas .....	79
3.16.10	Pérdida de peso de las uvas .....	81
3.16.11	Acidez total.....	81
3.16.12	Sólidos totales solubles.....	81
<b>CAPITULO 4: METODOLOGÍA.....</b>		<b>82</b>
4.	Metodología de trabajo.....	82
4.1	FASE 1: Extracción de quitina y quitosano .....	83
4.1.2	<i>Obtención de materia prima</i> .....	83
4.1.3	<i>Extracción de quitina y quitosano</i> .....	83
4.2	Caracterización de Quitosano .....	85
4.2.1	Determinación del Peso Molecular .....	85
4.2.2	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	86
4.2.3	Grado de desacetilación .....	86
4.2.4	Grado de <i>N</i> -acetilación.....	87
4.2.5	Determinación del contenido de cenizas.....	87
4.2.6	Rendimiento Total .....	87
4.2.7	Análisis Térmico (DSC).....	87
4.2.8	Análisis Termogravimétrico (TGA).....	88
4.2.9	Análisis Morfológico y elemental.....	88
4.3	FASE 2: Síntesis de nanopartículas de selenio .....	89
4.3.1	Preparación de extracto acuoso de <i>Pluchea Sericea</i> (Cachanilla).....	89
4.3.2	Caracterización del extracto acuoso .....	90
4.3.3	Análisis Cualitativo (Barrido fitoquímico .....	90
4.4	Síntesis verde de SeNPs .....	93
4.5	Caracterización de SeNPs.....	96
4.5.1	Espectroscopia UV-Vis.....	96
4.5.2	Dispersión Dinámica de Luz (DLS) .....	96
4.5.3	Espectroscopía infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR) .....	96

4.5.4 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	97
4.5.5 Microscopia electrónica de barrido y electrones dispersos de rayos X (SEM y EDS) .....	97
4.5.6 Análisis microbiológico.....	98
4.6 FASE 3: Elaboración de películas plásticas a base de biopolímeros .....	98
4.6.1 Procedimiento.....	99
4.7 Caracterización de películas plásticas a base de biopolímeros.....	102
4.7.1 Espesor de las películas plásticas.....	102
4.7.2 Densidad Aparente .....	102
4.7.3 Pruebas mecánicas .....	102
4.7.4 Porcentaje de contenido de humedad, grado de hinchabilidad y solubilidad.....	104
4.7.5 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	104
4.7.6 <i>Análisis Térmico (DSC)</i> .....	104
4.7.7 <i>Análisis Termogravimétrico (TGA)</i> .....	105
4.7.8 Análisis Morfológico y elemental.....	105
3.7.10 Actividad antimicrobiana .....	105
4.7.11 Biodegradabilidad en el medio ambiente .....	106
4.7.12 Aplicación como empaque alimenticio.....	106
4.7.13 Pérdida de peso de las uvas .....	106
4.7.14 Acidez total.....	107
4.7.15 Sólidos totales solubles.....	107
<b>CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>108</b>
<b>5. Resultados.....</b>	<b>108</b>
<b>5.1 Fase 1: Quitosano.....</b>	<b>108</b>
5.1.1 Determinación de Peso Molecular mediante viscosimetría .....	108
5.1.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	113
5.1.3 Rendimiento total .....	116
5.1.4 Contenido de Cenizas .....	117
5.1.5 Grado de Desacetilación (DDA).....	118
5.1.6 Grado de <i>N</i> -acetilación.....	119
5.1.7 Elección de muestra de quitosano.....	120
5.1.8 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	121

5.1.9	Análisis termogravimétrico (TGA).....	122
5.1.10	Análisis Morfológico y elemental.....	124
5.2	Fase 2: Síntesis verde de nanopartículas de selenio .....	126
5.2.1	Barrido fitoquímico de extracto acuoso de <i>P. Sericea</i> .....	126
5.2.2	Caracterización SeNPs por dispersión de luz dinámica (DLS).....	127
5.2.4	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	128
5.2.5	Espectroscopia visible ultravioleta (UV-Vis).....	129
5.2.6	Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	131
5.2.3	Energía Dispersiva de rayos x (EDS) .....	133
5.2.7	Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	134
5.2.8	Pruebas antimicrobianas (Difusión en agar).....	135
5.3	FASE 3: Elaboración de películas plásticas a base de biopolímeros .....	137
5.3.1	Apariencia, espesor y densidad aparente .....	137
5.3.3	Transparencia/opacidad .....	143
5.3.4	Morfología (SEM).....	144
5.3.5	Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	148
5.3.6	Espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR).....	150
5.3.7	TGA.....	153
5.3.8	DSC .....	156
5.3.9	Pruebas mecánicas: Esfuerzo de tracción, elongación y módulo de Young 158	
5.3.10	Análisis microbiológico (difusión en agar) .....	160
5.3.11	Biodegradabilidad en el suelo.....	163
5.3.12	Aplicación en uvas verdes (apariciencia).....	165
5.3.13	Pérdida de peso en uvas verdes (WLR%) .....	167
5.3.16	Acidez total en uvas verdes.....	168
5.3.17	Sólidos totales solubles (TSS) .....	169
CAPITULO 6 CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO .....		170
6.1	Las conclusiones por fase del proyecto.....	170
6.2	Conclusión general:.....	172
6.3	Trabajo a futuro: .....	172
CAPITULO VII. ANEXOS .....		199
7.1	Publicaciones.....	199

<b>7.2 Participaciones en congresos .....</b>	<b>199</b>
<b>7.3 Estancia de Investigación .....</b>	<b>200</b>
<b>7.4 Participaciones con el proyecto STEAM UABC .....</b>	<b>200</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de los biopolímeros basados en su origen.....	25
Figura 2: Formula general de los polisacáridos.....	26
Figura 3: Avances científicos sobre quitina y quitosano a lo largo de la historia.....	28
Figura 4 Estructura de la a) quitina y b) quitosano.....	29
Figura 5: <i>Farfantepenaeus Californiensis</i> .....	31
Figura 6: Pasos de extracción química de quitina y quitosano.....	34
Figura 7: Formas de análisis de FTIR.....	36
Figura 8: Funcionamiento de FTIR.....	36
Figura 9 Funcionamiento DSC.....	42
Figura 10: Termograma DSC.....	42
Figura 11: Tipos de análisis termogravimétrico.....	43
Figura 12 Análisis termogravimétrico sencillo.....	44
Figura 13 Escala nanométrica con ejemplos.....	45
Figura 14: Clasificación general de los nanomateriales.....	48
Figura 15 Clasificación de los métodos de síntesis de nanopartículas.....	49
Figura 16 Equipo de medición DLS.....	51
Figura 17: Espectroscopia UV-Vis.....	53
Figura 18 Microscopio Electrónico de Barrido.....	54
Figura 19. Microscopio de fuerza atómica (AFM).....	55
Figura 20 Difusión en Agar.....	56
Figura 21 Síntesis verde de nanopartículas utilizando extractos de plantas.....	57
Figura 22 Ubicación geográfica y taxonomía de la planta <i>P. Sericea</i> (Cachanilla).....	58
Figura 23 Clasificación general de los fitocompuestos.....	59
Figura 24 Ciclo de vida de los materiales a base de biopolímeros.....	65
Figura 25 Molécula de PVA.....	66
Figura 26 Características principales para materiales de aplicación de empaque alimenticio.....	69
Figura 27 Métodos de laboratorio para aplicación de biopolímeros en alimentos.....	71
Figura 28: Curva esfuerzo-deformación típica para películas bioplásticas.....	77
Figura 29: Prueba de tensión.....	78

Figura 30: Metodología de trabajo. ....	82
Figura 31: Pasos de extracción de quitina y quitosano por método químico.....	84
Figura 32: Montaje de viscosímetro Cannon-Fenske a temperatura controlada. ....	86
Figura 33 Proceso de elaboración de extracto acuoso de hojas de <i>P. Sericea</i> . ....	89
Figura 34: Identificación de metabolitos secundarios en el extracto <i>P. Sericea</i> .....	90
Figura 35: Síntesis verde de nanopartículas de selenio.....	95
Figura 36: Solución coloidal de SeNPs .....	95
Figura 37 Elaboración de película plástica de quitosano .....	100
Figura 38 Elaboración de película plástica Q/Se.....	100
Figura 39 Elaboración de película plástica Q/PVA.....	101
Figura 40 Elaboración de película plástica Q/PVA/Se.....	101
Figura 41: Probetas para pruebas mecánicas.....	103
Figura 42: Prueba mecánica en proceso.....	103
Figura 43 Regresión lineal de los puntos de viscosidad en función de la concentración (g/mL) de las muestras de quitosano extraído a diferentes tiempos de desacetilación. a) 1h, b) 2h, c) 3h d) 4h.....	111
Figura 44 Regresión lineal de los puntos de viscosidad en función de la concentración (g/mL) de las muestras de quitosano comercial. e) alto peso molecular f) medio peso molecular g) bajo peso molecular. ....	112
Figura 45: Espectros de quitosano comercial a distintos pesos moleculares.....	114
Figura 46: Espectros de quitosano extraído a diferentes tiempos de desacetilación..	114
Figura 47: Espectros comparativos entre quitina, quitosano comercial a bajo peso molecular y quitosano extraído por 2 h de desacetilación.....	115
Figura 48: Curva de titulación y derivada para las muestras de Q/1h (a) y (b), Q/2h (c) y (d).....	118
Figura 49: Curva de titulación y derivada para las muestras Q/3h (e) y (f), Q/4h (g) y (h). .....	119
Figura 50 Curva DSC de Quitina.....	121
Figura 51: Curva DSC Quitosano.....	121
Figura 52: Curva tga y Dtg de Quitina .....	123
Figura 53: Curva Tga y Dtg de quitosano.....	123

Figura 54: Micrografía SEM de quitina .....	125
Figura 55: Micrografía SEM de quitosano. ....	125
Figura 56: Distribución de tamaño de partícula SeNPs.....	128
Figura 57: Espectros FTIR comparativos de extracto acuoso <i>P. Sericea</i> y SeNPs ....	129
Figura 58 Espectro UV-Vis de SeNPs.....	130
Figura 59 Análisis SEM de SeNPs.....	132
Figura 60: Análisis SEM 2 de SeNPs.....	132
Figura 61: Espectro EDS.....	133
Figura 62 Histograma de alturas de SeNPs .....	134
Figura 63: Perspectiva 3D de SeNPs por AFM. ....	134
Figura 64: Halos de inhibición en análisis antibacteriano a) <i>E. Coli</i> y b) <i>S.Aureus</i> . ....	135
Figura 65: Resultados actividad antimicrobiana .....	136
Figura 66: Mecanismo antibacterial de SeNPs en bacterias. ....	136
Figura 67: Transparencia visual de las películas plásticas.....	137
Figura 68 Resultados pruebas MC%, SP% y S%. ....	140
Figura 69 Grafica comparativa de MC% de cada una de las películas plásticas. ....	141
Figura 70: Grado de hinchabilidad de las películas plásticas.....	142
Figura 71 Solubilidad de las películas plásticas. ....	143
Figura 72: Curvas de intensidad UV de las películas plásticas.....	144
Figura 73: Imagen SEM de la muestra Q.....	146
Figura 74: Imagen SEM de la muestra Q/Se.....	146
Figura 75: Imagen SEM de la muestra Q/PVA.....	147
Figura 76: Imagen SEM de la muestra Q/PVA/Se. ....	147
Figura 77: Imágenes AFM de las muestras a) Q, b) Q/Se, c) Q/PVA d) Q/PVA/Se. ...	149
Figura 78: Reticulación entre quitosano y PVA. ....	151
Figura 79: Espectros FTIR para las películas plásticas: a) Q, b) Q/Se, c) Q/PVA d) Q/PVA/Se.....	152
Figura 80: Espectros infrarrojos comparativos de cada una de las películas plásticas. ....	152
Figura 81: Curvas Tg y DTG para Q. ....	154
Figura 82: Curva Tg para a) Q/Se.....	155

Figura 83: Curva TG y DTG de Q/PVA. ....	155
Figura 84: Curva TG y DTG para Q/PVA/Se.....	155
Figura 85 Termograma DSC para a) Q y b) Q/Se .....	157
Figura 86: Termograma DSC para a) Q/PVA y b) Q/PVA/Se.....	157
Figura 87 Curva esfuerzo deformación de las películas plásticas.....	159
Figura 88: Mecanismo de acción antibacterial del quitosano en bacterias.....	161
Figura 89: Promedio de diámetros de inhibición para las películas plásticas. a) <i>E. Coli</i> , b) <i>S. Aureus</i> .....	162
Figura 90: Degradación en tierra de películas plásticas: a) Polipropileno comercial b) Q, c) Q/Se, d) Q/PVA, e) Q/PVA/Se. ....	164
Figura 91: Pérdida de peso en uvas verdes durante 10 días. ....	168

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fuentes principales de quitosano a partir de desechos de exoesqueletos de crustáceos marinos. ....	30
Tabla 3: Características de la especie <i>F. Californiensis</i> . ....	31
Tabla 4 Técnicas de caracterización utilizadas para caracterización de nanopartículas. ....	50
Tabla 5: Técnicas de identificación cualitativa para metabolitos en plantas. ....	62
Tabla 6: Tipos de biopolímeros utilizados en empaque alimenticio. ....	66
Tabla 7 Técnicas de caracterización para análisis de películas plásticas. ....	72
Tabla 8: Diferentes temperaturas en el método de desacetilación. ....	84
Tabla 9: Diversos métodos de síntesis de SeNPs en función de variables de temperatura, tiempo, morbilidad y cantidad en mL de reductor y extracto. ....	93
Tabla 10: Muestras que cumplen con los resultados para obtener SeNPs viables. ....	94
Tabla 11 Tipos de películas bioplásticas realizadas. ....	98
Tabla 12 Parámetros de solución patrón. ....	108
Tabla 13 Constantes correspondientes a quitosano. ....	109
Tabla 14: Ensayos de viscosimetría realizados a las muestras de quitosano. ....	109
Tabla 15 Resultados obtenidos de Viscosidad Intrínseca y Peso molecular de las muestras de quitosano comercial y extraído a diferentes tiempos de desacetilación. ....	113
Tabla 16: Rendimiento de quitina y quitosano a diferentes tiempos de desacetilación. ....	117
Tabla 17: Porcentaje de cenizas y pureza de quitosano extraído a diferentes tiempos de desacetilación. ....	117
Tabla 18: Resultados obtenidos por titulación para el cálculo del DDA. ....	119
Tabla 19: Porcentaje de transmitancia en función de la longitud de onda para la obtención del grado N-acetilación. ....	120
Tabla 20: Resultados para la muestra Q/2h. ....	120
Tabla 21: Fitocompuestos presentes en el extracto acuoso de <i>P. Sericea</i> . ....	126
Tabla 22: Tamaño de partícula, potencial Z y polaridad de SeNPs. ....	127
Tabla 23: Porcentaje en masa de elementos presentes en SeNPs. ....	133
Tabla 24 Espesor promedio y densidad aparente de las películas plásticas. ....	138

Tabla 25: Propiedades ópticas de las películas plásticas. ....	144
Tabla 26: Principales grupos funcionales presentes en las películas plásticas.....	151
Tabla 27 Propiedades mecánicas de las películas plásticas.....	159
Tabla 28: Actividad antibacterial de las películas plásticas. ....	162
Tabla 29: Apariencia visual de las uvas durante 10 días de almacenamiento de las muestras. ....	166
Tabla 30: Porcentaje en pérdida de peso de las uvas recubiertas.....	167
Tabla 31: Porcentaje de acidez total de las uvas verdes. ....	168
Tabla 32: Grados Brix e índice de madurez de las uvas verdes. ....	169

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue desarrollar películas plásticas a base de quitosano y alcohol polivinílico (PVA) funcionalizadas con nanopartículas de selenio (SeNPs), para aplicaciones en empaque de alimentos, específicamente en uvas verdes. Para el desarrollo de esta investigación se dividió el proyecto en 3 fases, la primera describe la extracción y caracterización de quitosano de la especie *Farfantepenaeus Californiensis* (*F. Californiensis*), la segunda fase se centró en la síntesis verde y caracterización de nanopartículas de selenio utilizando extracto acuoso de la planta *Pluchea Sericea* (*P. Sericea*) comúnmente conocida como cachanilla, para finalmente en la fase 3 utilizarlos para la elaboración de películas plásticas, añadiendo PVA. En esta última fase se realizaron 4 diferentes películas plásticas, variando en su composición: Quitosano (Q), Quitosano y SeNPs (Q/Se), Quitosano y PVA (Q/PVA) y quitosano, PVA y SeNPs. Para la caracterización del quitosano extraído, se obtuvo el peso molecular por medio de viscosimetría capilar, el grado de desacetilación. Las propiedades térmicas como la pérdida de peso con análisis termogravimétrico (TGA) y la transición vítrea se analizaron por Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para la caracterización de SeNPs, la forma, el tamaño, la distribución de partículas y el potencial Z se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopia UV-VIS, la morfología por microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia de fuerza atómica (AFM) así como sus propiedades antibacteriales contra cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bacterias recurrentes en alimentos contaminados en los supermercados. La caracterización de las propiedades mecánicas de las películas plásticas; resistencia a la tracción, alargamiento de rotura y el módulo de Young se analizaron en una máquina de prueba universal, mientras que las propiedades morfológicas se analizaron mediante SEM y AFM, así como sus propiedades térmicas con las técnicas de TGA y DSC para la transición vítrea. Finalmente, se probaron como película de empaque sobre uvas verdes para conocer la calidad de conservación durante el almacenamiento. Los resultados sugieren que las películas plásticas Q/PVA/Se, reducen significativamente el efecto de crecimiento de las bacterias evaluadas y tienen mejores propiedades en comparativa con las otras películas desarrolladas, esto contribuirá al desarrollo de nuevos materiales para la industria empaque de alimentos.

Además, este trabajo contribuye con el medio ambiente al sustituir películas de plástico sintético por un biopolímero procedente de residuos.

## ABSTRACT

The objective of this research was the development of plastic films based on chitosan and polyvinyl alcohol (PVA) functionalized with selenium nanoparticles (SeNPs), for applications in food packaging, specifically in green grapes. The first phase describes the extraction and characterization of chitosan from the species *Farfantepenaeus Californiensis* (*F. Californiensis*), the second phase focused on the green synthesis and characterization of selenium nanoparticles using aqueous extract of the plant *Pluchea Sericea* (*P. Sericea*) commonly known as cachanilla, and finally in phase 3 they were used for the elaboration of plastic films, adding PVA. In this last phase, 4 different plastic films were made, varying in their composition: Chitosan (Q), Chitosan and SeNPs (Q/Se), Chitosan and PVA (Q/PVA) and chitosan, PVA and SeNPs. For the characterization of the extracted chitosan, the molecular weight was obtained by capillary viscosimetry, the degree of deacetylation, and thermal properties such as weight loss by thermogravimetric analysis (TGA) and glass transition by differential scanning calorimetry (DSC). For the characterization of SeNPs, shape, size, particle distribution and Z-potential were characterized by dynamic light scattering (DLS) and UV-VIS spectroscopy, morphology by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) as well as their antibacterial properties on *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains recurrent bacteria in contaminated food in supermarkets. The characterization of the plastic films, where tensile strength, elongation at break and Young's modulus were analyzed as mechanical properties in a universal testing machine, the morphological properties of the films were analyzed by SEM and AFM, as well as their thermal properties with TGA and DSC for the glass transition. Finally, the plastic films were tested as a packaging film on green grapes to determine the quality of preservation during storage. The results suggest that the Ch/PVA/Se plastic films significantly reduce the growth effect of the bacteria evaluated and have better properties compared to the other films developed, which will contribute to the development of new materials for the

food packaging industry. In addition, this work contributes to the environment by substituting synthetic plastic films with a biopolymer from waste.

# CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

---

## 1. Introducción

En la actualidad los problemas de contaminación ambiental han crecido considerablemente, según los datos del Banco Mundial se generan mundialmente alrededor de 20 millones de toneladas de residuos sólidos al año y se estima que para el año 2050 este crecerá en un 70% <sup>[1]</sup>. En México, según las cifras publicadas en el Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales (SNIARN) en 2017 se generaron 44.6 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos, de los cuales el 11% corresponde a los plásticos <sup>[2]</sup>.

La generación de residuos plásticos en México proviene de diversas fuentes en las que se enfatiza aquellos que son de un solo uso, destacando el empaque de líquidos y alimentos, de este último la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales reportó que el 7.66% corresponde a los plásticos rígidos y de película <sup>[3]</sup>, destacando este último en aplicaciones en el sector del empaque alimenticio para alargar la vida de los alimentos desde su transporte, vida en anaquel y finalmente a manos del consumidor <sup>[4]</sup>.

Los materiales con los que se manufacturan las películas y recubrimientos plásticos traen problemas medio ambientales, ya que provienen de polímeros derivados del petróleo, como el polietileno o el polipropileno (por mencionar algunos) los cuales tardan mucho tiempo en degradarse <sup>[5]</sup>. Para minimizar esta problemática se ha optado por utilizar en la manufactura de estos productos materiales biodegradables a base de biopolímeros, ya que estos cumplen la misma función: evitar la oxidación y degradación de los alimentos, añadiendo la capacidad de degradarse a mayor velocidad, en comparación con los polímeros sintéticos, evitando así la contaminación por residuos plásticos <sup>[4]</sup>.

El almidón, la gelatina y el quitosano son los biopolímeros más comúnmente utilizados para estos fines <sup>[4]</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que estos materiales necesitan ser reforzados para un mejor rendimiento, tanto en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, y por lo que se busca agregar otros polímeros biodegradables como el PVA <sup>[6]</sup> o los nanomateriales como las nanopartículas (NPs) metálicas y no metálicas <sup>[7]</sup>.

La presente tesis tuvo como objetivo desarrollar y caracterizar películas plásticas a base de quitosano incorporando polímeros biodegradables y SeNPs. La realización de este trabajo va desde la extracción y caracterización de Q, la síntesis de las SeNPs, la elaboración de las películas plásticas, hasta su caracterización y aplicación como empaque de uvas verdes.

## **1.2 Planteamiento del problema**

Los alimentos que consumimos sobre todo frutas y verduras pasan por procesos de descomposición por diferentes causas, desde la oxidación, deterioro y contaminación por agentes patógenos, cosecha, recolección, transporte, almacenamiento, vida en anaquel y finalmente con el consumidor, por lo que se ha optado por utilizar materiales de tipo plásticos sintéticos para protegerlos de esos factores. Sin embargo, en los últimos 30 años estos materiales protectores han ocasionado daños al medio ambiente por su baja capacidad de biodegradabilidad, aunado a que no tienen efecto directo de protección ante patógenos externos sobre las frutas y verduras, por lo que se han estado buscando alternativas más amigables con el medio ambiente para reemplazarlos. Las películas plásticas a base de biopolímeros como el Q tienen propiedades antibacterianas naturales, además de su alta biodegradabilidad, sin embargo, no tienen buenas propiedades mecánicas por lo que se buscan otras opciones como el PVA para mejorarlas, además de la adición de NPs metálicas por ruta verde para aumentar su capacidad antimicrobiana.

En este trabajo se propuso la extracción y caracterización de Q, la síntesis verde de SeNPs y el desarrollo de películas plásticas a base de los biopolímeros mencionados y funcionalizados con SeNPs.

## **1.3 Justificación**

La contaminación ambiental por el uso de plásticos en empaques de alimentos, así como la velocidad de descomposición por agentes externos es un problema muy común hoy

en día. En este trabajo se propone producir quitosano a partir de la quitina contenida en exoesqueletos de camarón para utilizarlo en la fabricación de películas plásticas modificadas con PVA y funcionalizadas con SeNPs sintetizadas por medio de ruta verde y aplicarlas en el empaque seguro de frutas y verduras.

#### **1.4 Objetivo General**

Desarrollar y caracterizar diferentes mezclas de películas plásticas a base de Q extraído de exoesqueletos de camarón *F. Californiensis* y PVA, funcionalizadas con SeNPs sintetizadas por medio de ruta verde con extracto acuoso de *P. Seríceea* para aplicaciones de empaque alimenticio en uvas verdes para evitar su rápida degradación por agentes externos y patógenos.

#### **1.5 Objetivos específicos**

- Extraer Q de desechos de exoesqueletos de camarón de la especie *F. Californiensis* por medio del método químico.
- Elegir el mejor método de desacetilación en función de las horas de extracción para obtener Q de calidad según lo establecido por medio de métodos de caracterización.
- Sintetizar SeNPs en solución coloidal por medio de síntesis verde, utilizando extracto acuoso de la planta *P. Seríceea*.
- Caracterizar los extractos acuosos para obtener los metabolitos secundarios que fungirán como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de SeNPs.
- Desarrollar películas plásticas a base de Q extraído y PVA funcionalizadas con SeNPs teniendo diferentes mezclas de biopolímeros: Quitosano (Q), Quitosano y SeNPs (Q/Se), Quitosano y PVA (Q/PVA) y Quitosano, PVA y SeNPs (Q/PVA/Se).
- Caracterizar cada una de las películas plásticas.
- Aplicar las películas plásticas como empaque de uvas verdes.

- Elegir la mejor película plástica que cumpla con las características deseables para aplicaciones futuras en empaque de frutas.

## **1.6 Hipótesis**

Las películas plásticas a base de Q/PVA funcionalizadas con SeNPs son una opción viable y optima como sustituto en el uso de polímeros sintéticos para aplicaciones en frutas como empaque para proteger y retardar su degradación.

## CAPITULO 2: ANTECEDENTES

---

La aplicación de Q como película plástica ha sido estudiada durante años, gracias a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, además de que la extracción de este es una alternativa para reducir los desechos de exoesqueletos de crustáceos marinos (camarón, cangrejo y langosta) en los puertos, playas y restaurantes de mariscos, aprovechando de esta manera la biomasa para aplicaciones de protección contra degradación de los alimentos <sup>[8]</sup>. Sin embargo, las películas plásticas a base de quitosano tienen propiedades mecánicas muy bajas, por lo que resulta interesante investigar opciones de formulación y fabricación de películas a base de mezclas con otros biopolímeros como gelatina <sup>[8]</sup>, pectina <sup>[9]</sup>, almidón <sup>[10]</sup>, celulosa <sup>[11]</sup>, carboximetilcelulosa <sup>[12]</sup> y PVA <sup>[13]</sup> por mencionar algunos, donde una de las mejores opciones es el PVA, un polímero biodegradable artificial que es utilizado en el área alimenticia y médica <sup>[14]</sup>.

Lo'ay et al, desarrollaron un recubrimiento plástico a base de Q y PVA con ácido ascórbico para proteger uvas, donde se obtuvieron resultados favorables, en este estudio se hizo variación de la cantidad de quitosano y PVA añadidos a la mezcla <sup>[15]</sup>. Coneo et al, estudiaron de forma similar un recubrimiento funcionalizado con NPs de ZnO, para aumentar su capacidad antibacteriana en empaques de alimentos, donde obtuvieron resultados favorables en propiedades mecánicas y contra *E. Coli* <sup>[16]</sup>. Sin embargo, aun cuando se refuerzan para mejorar sus propiedades estos dos biopolímeros, se busca potencializar su capacidad antimicrobiana ante muchos patógenos existentes en los alimentos, en particular las frutas, las cuales pasan por un largo camino antes de llegar al consumidor <sup>[16]</sup>.

Por lo que las NPs metálicas y no metálicas con propiedades antimicrobianas se utilizan como auxiliar en las mezclas de biopolímeros para aumentar las propiedades antimicrobianas del Q. Las SeNPs están siendo aplicadas actualmente en el sector alimenticio, ya que cuentan con una baja toxicidad y una alta biocompatibilidad <sup>[17,18]</sup>, en comparación con otras formas de Selenio, las SeNPs, tienen propiedades antioxidantes, antivirales, antimicrobianas y antifúngicas <sup>[19]</sup>, convirtiéndolo en una opción viable para aplicación contra patógenos que afectan la calidad de los alimentos <sup>[19,20]</sup>.

Menazea et al. desarrollaron una matriz a base de Q y PVA con SeNPs sintetizadas por ablación laser, en donde demostraron la capacidad de este material para empaque en futuras con aplicaciones antibacterianas <sup>[21]</sup>. Por otra parte, Bongekile et al, aplicaron una solución coloidal de SeNPs en un filme de almidón de papa para aplicaciones como empaque de alimentos, donde se agregó la propiedad antibacteriana de las NPs al polímero, teniendo resultados positivos, tanto en las propiedades mecánicas como en las microbicidas <sup>[22]</sup>.

# CAPITULO 3: MARCO TEÓRICO

## 3.1 Polímeros

La palabra polímero viene del latín “Poli” = muchos, “meros” = segmentos/partes, entendiendo esta definición, se considera que los polímeros, son macromoléculas, es decir moléculas de tamaño grande, que constan de largas cadenas o redes moleculares que con frecuencia están basadas en compuestos orgánicos (Carbono en su composición), unidas por enlaces covalentes. [23]

Existen distintas clasificaciones para los polímeros, y una de ellas es a partir de su origen, la cual se divide en 2: Biopolímeros o Naturales, Sintéticos [24] y semi-sintéticos [25].

## 3.2 Biopolímeros

Se define como biopolímeros a aquellos que provienen de organismos vivos [26], estos pueden ser clasificados en 3 grandes categorías (figura 1), basándose en su origen y método de producción, extraídos de biomasa, sintetizados por monómeros bioderivados y los producidos por microorganismos [27].

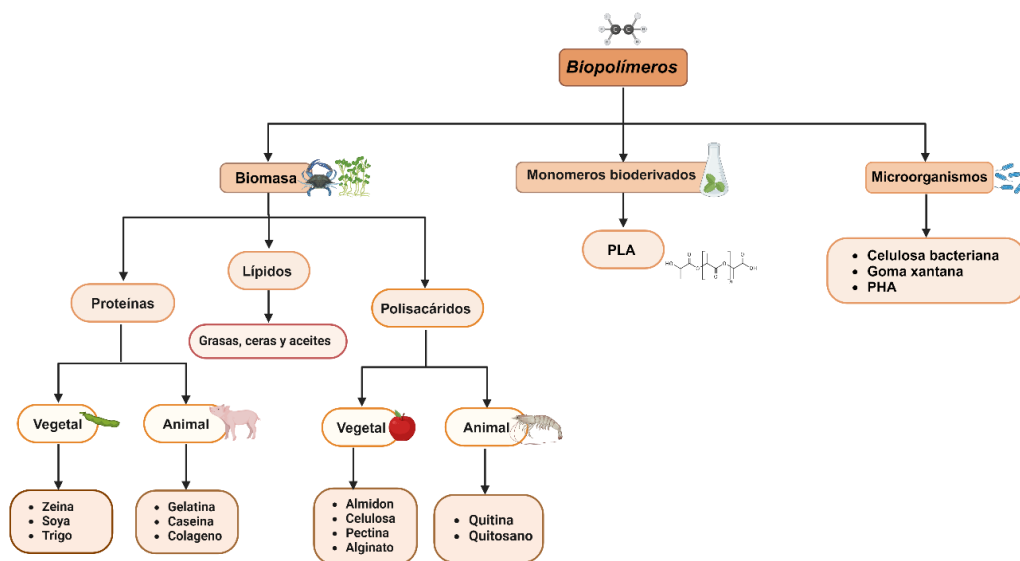
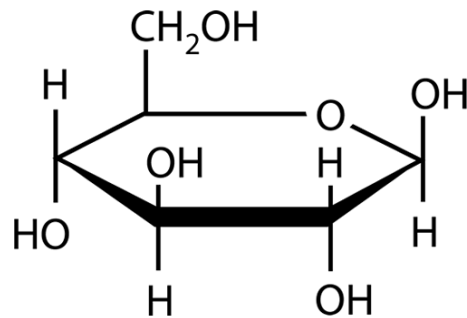


Figura 1: Clasificación de los biopolímeros basados en su origen.

### 3.2.1 Biopolímeros obtenidos de biomasa: Polisacáridos

En la actualidad la industria agroalimentaria y marina genera una cantidad grande de desechos, los cuales están siendo aprovechados como fuente de biopolímeros, específicamente los polisacáridos, tanto de origen vegetal como de origen animal en el caso de los residuos de crustáceos marinos.

Los polisacáridos son biomoléculas vitales para los seres vivos, están constituidas por homo y hetero monosacáridos asociados a enlaces glicosídicos. También, son conocidos comúnmente como carbohidratos. Los polisacáridos están compuestos por monosacáridos como las cetonas e hidroxialdehídos. Además, los enlaces de hidrogeno se forman entre las cadenas poliméricas gracias a la presencia del grupo hidroxilo (OH) en los monosacáridos. En la figura 2, se observa la estructura general de los polisacáridos. La repetición de unidades de glucosa tiene un patrón el cual resulta en una cadena larga de glucosa, que adquieren una estructura helicoidal, la cual es responsable por ejemplo de las propiedades mecánicas de la celulosa o en otros polisacáridos como la quitina y glicógeno. Esta estructura provee a estos biopolímeros rigidez y la capacidad de almacenar glucosa para obtener energía [28].



**Figura 2:** Formula general de los polisacáridos.

### 3.3 Quitina y Quitosano

*“Je vais faire connaître la nature de la substance qui forme le corps ou la base charnue insoluble du champignon, et que je désignerai sous le nom de fungine”.*

Henri Braconnot, 1811.

#### 3.3.1 Reseña Histórica

Se tiene documentado que los primeros estudios que se asocian al descubrimiento de la quitina fueron por el científico francés Charles Hatchet en 1799, realizándolo de los exoesqueletos de crustáceos (cangrejos, langostas y camarones) con ácido nítrico, describiendo que existe efervescencia del material en presencia de soluciones acidas, resultando como un polímero muy resistente, aun cuando no le dio continuidad a ese estudio, este fue un parteaguas para el descubrimiento de la quitina [29]. Posteriormente hasta el año 1811 Henri Braconnot, un profesor de Historia Natural y miembro de la Academia de Ciencias en Nancy, Francia aisló por primera vez lo que hoy conocemos como quitina a partir de hongos mediante soluciones alcalinas. Braconnot fue el primero en publicarlo, llamándolo “fungine”. Diez años después de esta publicación, August Odier, le da el nombre de “Quitina” y lo publica en Société d’Histoire Naturelle de Paris. La historia del quitosano comienza poco después en 1859, cuando Charles Rouget se da cuenta que al hervir hidróxido de potasio con quitina se obtiene un producto con características diferentes, llamándolo “chitine modifiée”. Pero, no fue hasta 1894 que Felix Hoppe-Seyler repitió el experimento de Rouget, estableciendo que la transformación de la quitina sucede a la temperatura de 180 °C, llamándolo “Quitosano” [30]. A partir del siglo XX, numerosos estudios se concentraron en revelar su estructura, composición y propiedades fisicoquímicas (1876-1963). Continuando con encontrar métodos más eficientes de extracción y su escalamiento a nivel industrial. En la actualidad, se procura incrementar las aplicaciones de estos biopolímeros, así como su incorporación en diferentes productos. La figura 3 muestra el avance científico de estos dos biopolímeros a lo largo de la historia [31].

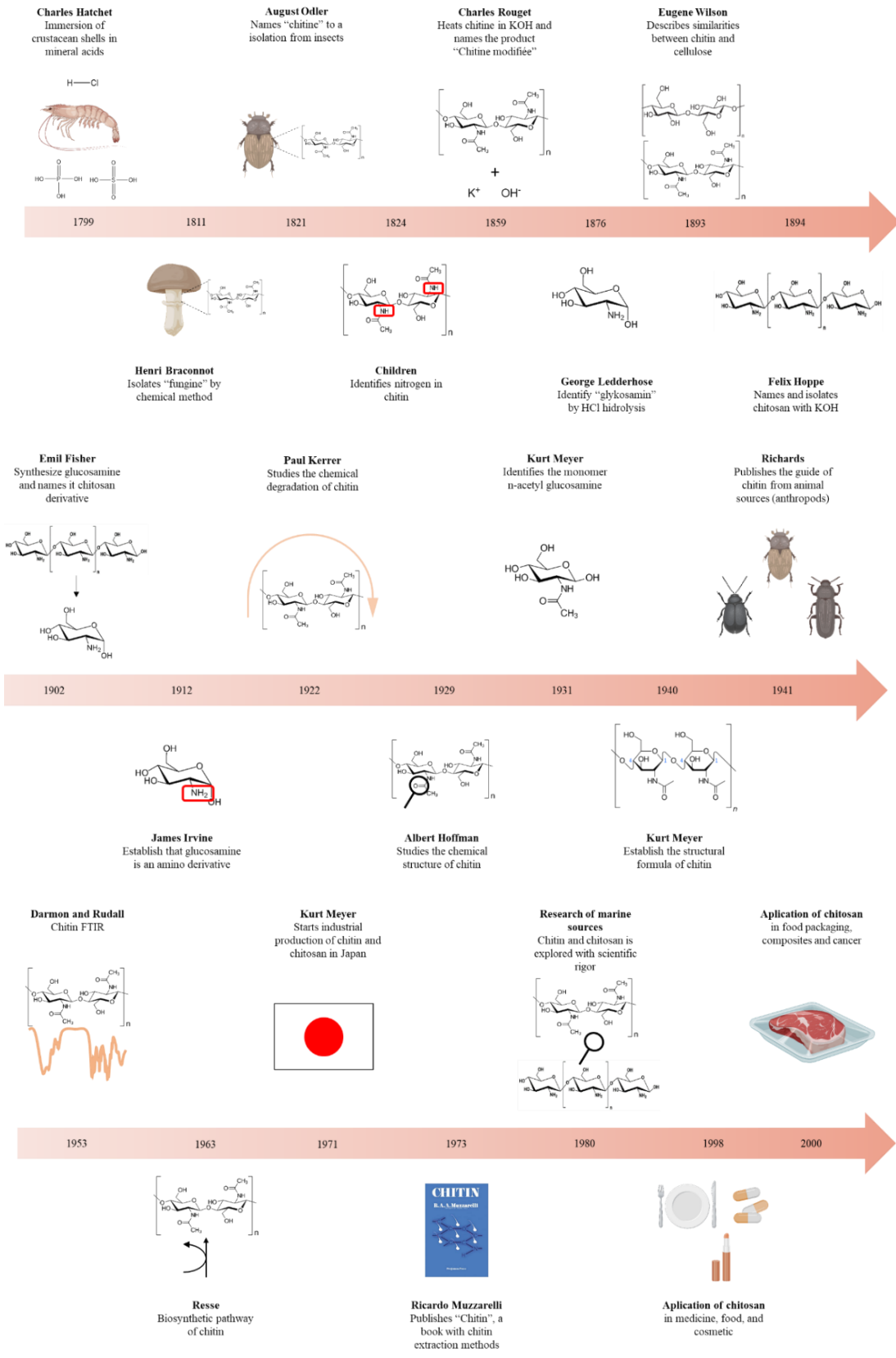


Figura 3: Avances científicos sobre quitina y quitosano a lo largo de la historia.

### 3.3.2 Definición

La quitina ( $C_8H_{13}O_5N$ )<sub>n</sub> es un polisacárido lineal nitrogenado muy abundante en la naturaleza, a este le precede únicamente la celulosa, tomando el segundo lugar en cuanto a presencia en el planeta [32], convirtiéndolo en un recurso natural renovable proveniente principalmente de biomasa de los desechos de exoesqueletos de crustáceos marinos (camarón, cangrejo y langosta) generados por la industria pesquera, sin embargo también se puede encontrar en menor cantidad en una variedad de hongos e insectos (ver tabla 1), ya que actúa como componente estructural y de defensa de la pared celular de estos [31].

La quitina tiene una composición química de unidades *N*-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos β (1 → 4) formando cadenas con unidades monoméricas desacetiladas [33]. La estructura de la quitina es ordenada y cristalina, tiene un peso molecular alto, baja reactividad química, es insoluble en agua y solventes orgánicos, y físicamente es de color blanco y textura rígida.

El Q es un polisacárido lineal obtenido por medio de desacetilación parcial bajo condiciones alcalinas de la quitina [34], tiene una composición de unidades *N*-acetyl-D-glucosamina y D-glucosamina conectadas por enlaces β (1,4) glicosídicos [35], es insoluble en agua, pero con alta solubilidad en diferentes tipos de ácidos y con baja reactividad química [36]. En la figura 4 se tienen la estructura de la quitina y Q.

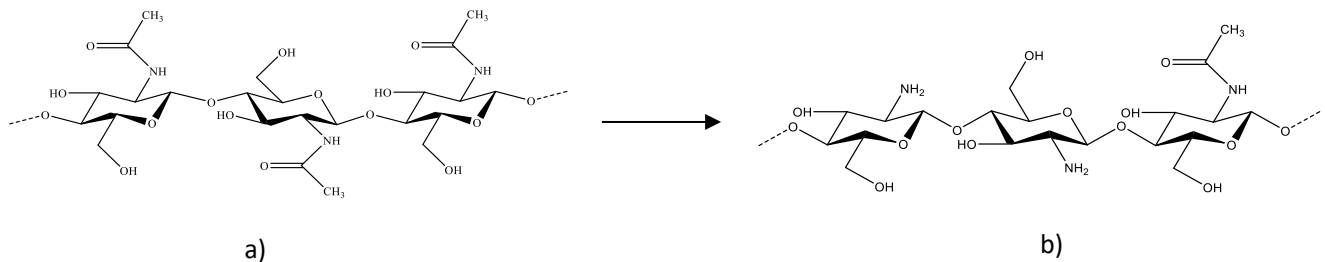


Figura 4 Estructura de la a) quitina y b) Q

### 3.3.3 Fuentes de quitina y quitosano

La quitina y Q son encontrados en hongos, insectos y principalmente en los exoesqueletos de crustáceos. Enfocándonos en las fuentes marinas, su porcentaje varía considerablemente dependiendo de sus clases y subclases [13]. Para el uso comercial y laboratorio, las principales empresas de reactivos como Merck proveen quitina y Q procedentes del camarón (*Pandalus borealis*) con diferentes grados de acetilación y pureza. Otros camarones que han sido estudiados para la extracción de quitina y Q son *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus semisulcatus* y *Fenneropenaeus indicus* teniendo resultados variados en contenido de quitina, peso molecular y grado de acetilación [37,38]. Además de los camarones, otros crustáceos han sido estudiados aprovechando sus residuos procedentes de su explotación económica utilizando la biomasa como una fuente potencial de quitina y quitosano. Ejemplo de estos crustáceos son la langosta, cangrejo, y calamar, en la tabla 1 se muestra el contenido en % de quitina de cada uno, así como su peso molecular y su grado de desacetilación.

**Tabla 1:** Fuentes principales de quitosano a partir de desechos de exoesqueletos de crustáceos marinos.

Fuente	Contenido de Quitina (%)	Peso Molecular (kDa)	Grado de Deacetilación (%)	Referencias
Camarón	16-23	25-28	32-79	[39,40]
Langosta	17.50-20.0	20.0-35.0	65.0-84.76	[41,42]
Cangrejo	21.23-27.5	23.0	70.0	[43,44]
Calamar	23.75-30.2	21.0	68.0-96.4	[29,30]

### 3.3.4 Especie *Farfantepenaeus Californiensis*

Los camarones son parte de los crustáceos marinos, la especie *F. Californiensis* (figura 5) pertenece a la familia de los camarones *Peneidos*, los cuales tienen un valor comercial de gran importancia en el mundo, tanto para el cultivo como para las pesquerías. En la tabla 3 se describen las características de este género de camarón. [45]



**Figura 5:** Farfantepenaeus Californiensis.

**Tabla 2:** Características de la especie *F. Californiensis*.

Nombre común	Nombre científico	Habitat	Talla
Camarón café, camarón patiamarillo	<i>Farfantepenaeus Californiensis</i>	Fondos arenosos o lodosos, entre 2 y 180 m de profundidad, pero es más abundante entre 25 y 50 m. Es típicamente marina, pero los juveniles se encuentran ocasionalmente en lagunas.	Máxima: 24 cm de longitud total.

Esta especie se encuentra entre las más producidas, aportando el 40% de producción total en México, la cual aporta mundialmente en producción y pesca en conjunto con otras especies el 60%. <sup>[46]</sup> Su ubicación importante es en el Golfo de California (Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa), extendiéndose por toda la costa hasta Guatemala. <sup>[47]</sup>

### 3.4 Método de extracción de quitina y quitosano

En su composición además de la quitina los exoesqueletos contienen minerales y proteínas, que en conjunto proveen a estos seres vivos un cuerpo con mayor rigidez para su supervivencia en el medio ambiente en el que viven y para agentes externos <sup>[44]</sup>.

Sin embargo, estos minerales y proteínas deben ser retirados de la quitina para obtener un producto de calidad. Para la eliminación de estos compuestos secundarios, la extracción se lleva a cabo generalmente en cuatro pasos: acondicionamiento de la materia prima, desmineralización, desproteínización y blanqueo. A su vez, estos pasos

pueden ser categorizados en dos métodos de extracción, que son el método biológico y el método químico, que es el que se utilizó en este trabajo [48].

### 3.4.1 Acondicionamiento de la Materia Prima

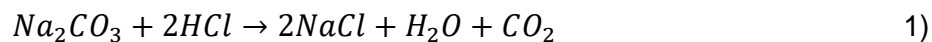
Tanto en el método químico como el método biológico, el acondicionamiento de la materia prima consiste en el lavado, desinfección, secado y triturado.

### 3.4.2 Extracción Química de quitina

El método químico involucra principalmente el uso de ácidos fuertes, con distinción de la temperatura aplicada, siendo homogéneo cuando la temperatura se encuentra en el rango de 25 a 40°C y heterogéneo a temperaturas entre 60 y 100°C. El incremento de la temperatura se ve recompensada con el decremento del tiempo de inmersión, encontrándose para el heterogéneo en un rango de 0.5 a 9 h y para el homogéneo hasta 72 h [49].

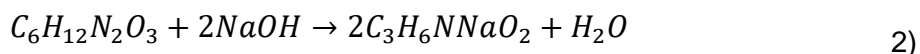
El primer paso para la obtención de quitina, es la desmineralización, la cual se efectúa utilizando ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido nítrico como principales [50].

El uso de estos ácidos tiene como propósito generar una reacción química con los minerales teniendo como productos minerales disueltos en agua y dióxido de carbono liberado en forma de gas. Estas reacciones pueden ser apreciadas en la ecuación 1 usando ácido clorhídrico (ácido más utilizado por su eficiencia de extracción):



Sin embargo, el riesgo de los ácidos fuertes ha llevado a buscar alternativas para el proceso de desmineralización de la quitina, resultando en la aplicación de ácidos débiles como el ácido acético y cítrico, aumentando el tiempo de inmersión, pero reduciendo el tiempo de neutralización y residuos del producto final [49].

El tercer paso es la desproteínización. En este paso, se utilizan bases como el hidróxido de sodio e hidróxido de potasio con la intención de generar una reacción entre la base y la proteína para obtener sal y agua. Esta reacción es plasmada en la ecuación 2 tomando de ejemplo el hidróxido de sodio (base más utilizada en la industria) <sup>[51]</sup>:



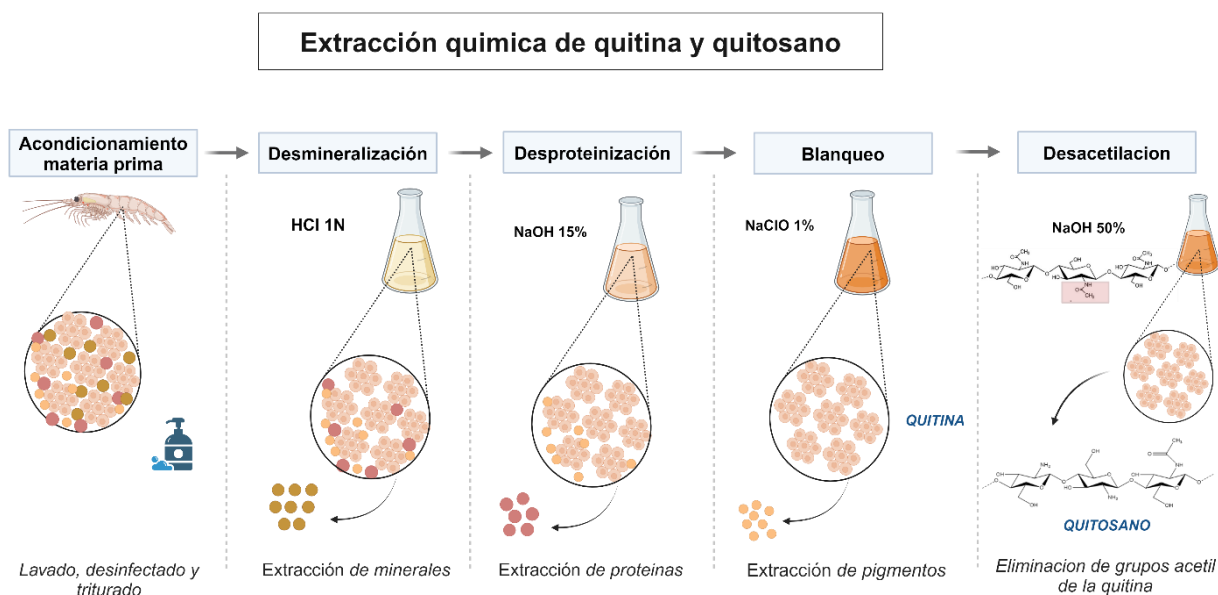
Posteriormente se realiza el blanqueo del producto, como paso opcional, ya que tiene el propósito de eliminar el color característico de los caparzones y exoesqueletos de crustáceos marinos procedentes de pigmentos como la astaxantina, cantaxantina, astaceno, luteína y carotenos. Estos pigmentos pueden ser extraídos con solventes orgánicos a temperatura ambiente. Ejemplo de estos solventes son acetona, cloroformo, éter, butil acetato o combinación de éstos <sup>[51]</sup>.

### 3.4.3 Extracción de quitosano

El aislamiento del Q se lleva a cabo mediante la eliminación de los grupos acetyl de la quitina, por un proceso llamado desacetilación <sup>[52]</sup>. Los factores que afectan el grado de desacetilación, son la concentración de la solución alcalina, el tratamiento previo, el tamaño de partícula y la densidad de la quitina. Estos últimos afectan directamente la velocidad de penetración de las soluciones alcalinas en la región amorfa y en las regiones cristalinas del polímero, lo cual es necesario para que la hidrólisis se lleve a cabo. En la práctica, el máximo grado de desacetilación es alrededor del 85% para el método químico y 90% para el método biológico <sup>[42]</sup>.

Al igual que en el proceso de extracción de la quitina, el aislamiento del quitosano se lleva mediante métodos químicos (homogéneo o heterogéneo). En la desacetilación homogénea, las soluciones alcalinas usadas se encuentran a una concentración de 40-50%, 12 a 24h de inmersión y a temperatura ambiente. En cambio, en la heterogénea, la solución alcalina se calienta a temperatura de ebullición, a una concentración de 40-50% y un tiempo de inmersión de 1 a 5 h <sup>[52]</sup>. Esta variación en los parámetros resulta en un incremento en la hidrólisis en el método heterogéneo. Este último también es el preferido

para producir Q a gran escala debido a que el corto tiempo de reacción comparado con el método homogéneo y las altas temperaturas, que da como resultado una reacción química preferencial en las regiones amorfas del polímero, dejando casi intactas las regiones cristalinas en la quitina original [42]. En la figura 6 se muestra un diagrama con cada uno de los pasos para la extracción química de quitina y quitosano.



**Figura 6:** Pasos de extracción química de quitina y quitosano.

### 3.5 Métodos de caracterización de quitosano

Para obtener quitosano con propiedades físicas y químicas óptimas y de excelente calidad, se realizan una serie de métodos de caracterización, los cuales se describen a continuación:

#### 3.5.1 Contenido de Cenizas

Para obtener el contenido de cenizas, el quitosano extraído es tratado por medio de pirólisis. La muestra se calienta a 600°C con una rampa de calentamiento de °C/min por 5h y el producto resultante es pesado en una balanza analítica. Para el cálculo del % de Cenizas se utiliza la ecuación 3 [53]:

$$\%Cenizas = \frac{MR}{MS} \times 100 \quad 3)$$

Donde MS es el peso en gramos de la muestra inicial y MR el peso gramos del residuo.

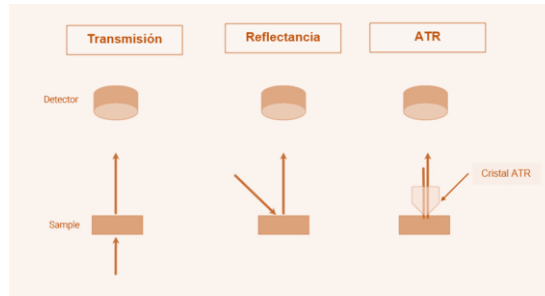
### 3.5.2 Rendimiento Total

Para el cálculo del rendimiento de extracción de quitina y quitosano, se utiliza la ecuación [44]:

$$Rendimiento\ Quitosano\ (\%) = \frac{Peso\ quitosano}{Peso\ exoesqueletos} \times 100 \quad 4)$$

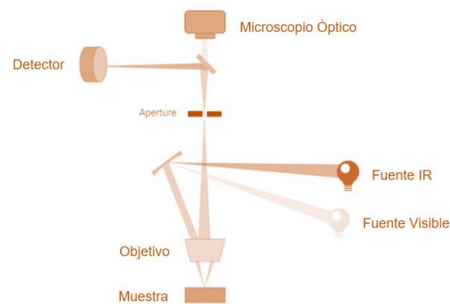
### 3.5.3 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, o también conocida como FTIR (del inglés, Fourier Transform Infra-Red) o simplemente IR, estudia los fenómenos de interacción entre la radiación de origen infrarrojo y la materia. Específicamente la energía de la radiación, localizada en determinada longitud de onda del infrarrojo, la cual es absorbida por una molécula (o parte de ella) que se encuentra vibrando en su estado basal a la misma longitud de onda que la radiación infrarroja incidente, provocando con ello un cambio en la intensidad de la vibración [54]. Para el análisis de materiales, en primer lugar, la luz IR incide sobre la muestra e interactúa con ella. Después, esa luz IR se detecta para crear el espectro FT-IR, que se puede utilizar para identificar, caracterizar y cuantificar las diferentes sustancias que se encuentran en la muestra. Dependiendo de la muestra, el análisis FT-IR se puede realizar de varias formas: Transmisión, Reflexión y Reflectancia total atenuada (ATR). Ver figura 7.



**Figura 7:** Formas de análisis de FTIR

Cuando la muestra se analiza en el equipo utilizando ATR, transmisión o reflexión, la luz IR interactúa con la muestra en la región de interés y luego se envía a un detector. Pero antes de que la luz IR llegue al detector, se envía a través de una abertura para garantizar que solo la luz IR correspondiente a la región de interés llegue al detector para su análisis, una vez que la luz IR llega al detector, se crea el espectro FT-IR. Esto proporciona una gran cantidad de información química sobre la muestra en la región de interés. (Figura 8) [55].



**Figura 8:** Funcionamiento de FTIR.

La técnica FTIR es una técnica eficiente y poderosa para la caracterización de polímeros. Es una técnica rápida y económica que arroja resultados sobre la composición química, la microestructura, las interacciones entre moléculas, da resultados tanto cualitativos como cuantitativos, dando posibilidad de entender las interacciones específicas de los mecanismos de reacción entre los materiales, y esto permite el desarrollo de nuevos materiales poliméricos [56].

### 3.5.4 Grado de Desacetilación

El proceso de desacetilación es aquel que remueve los grupos acetyl de la cadena molecular de la quitina, dejando como resultado un compuesto con alto grado de la presencia del grupo amino  $-NH_2$  el cual es el quitosano <sup>[57]</sup>. Este método de caracterización, consiste en disolver el quitosano en un exceso de ácido clorhídrico (HCl) para que ocurra la protonación del grupo amino libre del quitosano y posteriormente se realiza una valoración con hidróxido de sodio (NaOH) hasta que el pH de la solución se estabilice, lo cual permite obtener una curva de titulación del quitosano, la cual ha de presentar dos puntos de inflexión. La diferencia entre estos proporciona la razón de la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano; la concentración de estos se puede determinar mediante la ecuación 5 <sup>[58]</sup>:

$$\%NH = 16.1 (V_2 - V_1) (M_b) / W \quad 5)$$

Donde “ $V_2$ ” es el punto de inflexión mayor, “ $V_1$ ” el punto de inflexión menor (expresados en volúmenes), “ $M$ ” la molaridad de la solución de NaOH, “ $W$ ” la masa en gramos de la muestra y 16.1 es un factor asociado al tipo de proteína de estudio.

### 3.5.5 Grado N-Acetilación

El grado de *N*-acetilación se define como la fracción o porcentaje de las unidades glicosídicas *n*-acetiladas de la quitina o el quitosano <sup>[59]</sup>. El grado de acetilación, junto con el peso molecular, son los parámetros más importantes para identificar las propiedades fisicoquímicas del quitosano. Estos dos parámetros varían de la fuente biológica de materia prima y el método de preparación elegido. También, tiene relación con las propiedades biológicas, físicas y químicas, ya que dictaminarán el uso final del producto <sup>[60]</sup>. Entre las técnicas más comunes de caracterización del grado de acetilación se encuentran la valoración ácido-base, valoración potenciométrica, la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) y FT-IR <sup>[51]</sup>, aplicándose para este estudio la última.

En el análisis por FT-IR del quitosano se utiliza la Ecuación 6 donde se toma la razón de las bandas características de la amida I ( $1630\text{cm}^{-1}$ ) y la banda de los grupos hidroxilo ( $3437\text{cm}^{-1}$ ). Por otra parte, para el *N*-acetilación del quitosano, la Ecuación 7 expresa la razón de las bandas características de la amida III ( $1320\text{cm}^{-1}$ ) y los grupos metilo ( $1420\text{cm}^{-1}$ ) [59]:

$$\text{Grado } N - \text{ acetilación (\%)} = \left( \frac{A_{1630}}{A_{3437}} \right) * 115 \quad 6)$$

$$\text{Grado } N - \text{ acetilación (\%)} = \left( \frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 12.2 \quad 7)$$

Posteriormente se calcula el grado de *N*-Acetilación de la quitina y Q aplicando la Ecuación 8 [60]:

$$\text{Grado de DA(\%)} = 100 - \text{ grado de } N \text{ acetilación} \quad 8)$$

### 3.5.6 Viscosidad

Una de las propiedades más importantes presentes en el Q es su naturaleza catiónica en soluciones ácidas ( $\text{pKa}=56.0$ ). Estas cargas proporcionan a la solución del Q un comportamiento polielectrolítico debido a las cargas de repulsión entre las moléculas resultando en un aumento de la viscosidad [51].

A nivel molecular, la viscosidad de una solución de Q, es una medida directa del volumen hidrodinámico de las moléculas del polímero, el cual determina el peso molecular y el tamaño de las cadenas poliméricas [61]. La viscosidad del Q puede ser calculada con el cálculo de viscosidad intrínseca que mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado, su valor depende del tamaño y forma de la molécula de soluto la cual sirve como referencia para calcular el peso molecular del polímero. Entre las técnicas de caracterización para el cálculo de viscosidad intrínseca, se encuentra la viscosimetría capilar [52].

### 3.5.7 Caracterización por Viscosimetría Capilar

Esta técnica se realiza con ayuda de un viscosímetro capilar (Cannon- Fenske, Ostwald o Hubbelohde). Para aplicar este método de caracterización se debe conocer y calcular diferentes definiciones de viscosidad, para transformar la viscosidad cinemática (medida) en la viscosidad reducida y a partir de la antes mencionada calcular la viscosidad intrínseca y el peso molecular. Para realizar este experimento se utilizan las ecuaciones 6 a 9 [62].

*Viscosidad relativa:*

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad 9)$$

*Viscosidad específica:*

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad 10)$$

*Viscosidad Reducida:*

$$\eta_{red} = \left( \frac{\eta_{sp}}{c} \right) \quad 11)$$

*Viscosidad Intrínseca:*

$$[\eta] = \left( \frac{\eta_{sp}}{c} \right) \lim_{c \rightarrow \infty} \quad 12)$$

Donde:

$\eta$  es la viscosidad de la solución

$\eta_0$  es la viscosidad del solvente puro.

C Concentración de quitosano en la solución

### 3.5.8 Peso molecular

El peso molecular definido como el número de unidades monoméricas de un polímero, tiene una importancia notable cuando se habla de polisacáridos debido a que afecta

directamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas [30]. El peso molecular de la quitina y quitosano varía considerablemente dependiendo del proceso de extracción, desmineralización y desacetilación, ya que estos influyen en las cadenas poliméricas de la estructura [63]. El peso molecular se clasifica en bajo (50000-190000), medio (190000-310000) y alto (310000-375000) y su unidad de medida son los Dalton o g/mol. A su vez, estos pesos moleculares designan las aplicaciones finales del polisacárido, siendo comúnmente el de bajo peso molecular orientado a empaque, medio peso molecular a ingeniería de alimentos y alto peso molecular a biotecnología [64].

Las técnicas usadas para la caracterización del peso molecular del Q son las mismas que la de los polímeros sintéticos, necesitando usualmente su disolución en soluciones acidificadas antes de su caracterización. Ejemplos de estas técnicas son cromatografía de exclusión de tamaño e índice de refracción y viscosimetría capilar (Ecuación de Mark-Houwink Sakurada), utilizando esta última en este trabajo [52].

Una vez calculado y obtenido el valor de la viscosidad intrínseca, se puede obtener el valor del peso molecular, siempre y cuando el polímero obedezca la ecuación de Huggings (13), esto es, si presenta un comportamiento lineal entre la concentración y la viscosidad reducida:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + K[\eta]^2 C \quad 13)$$

Posteriormente se extrapola el resultado a concentración nula. Para un sistema polímero – solvente se utiliza la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = k \times M_w^\alpha \quad 14)$$

Donde:

$k$  y  $\alpha$  son las constantes de conformación del polímero

### 3.5.9 Análisis térmico: Calorimetría diferencial de Barrido (DSC)

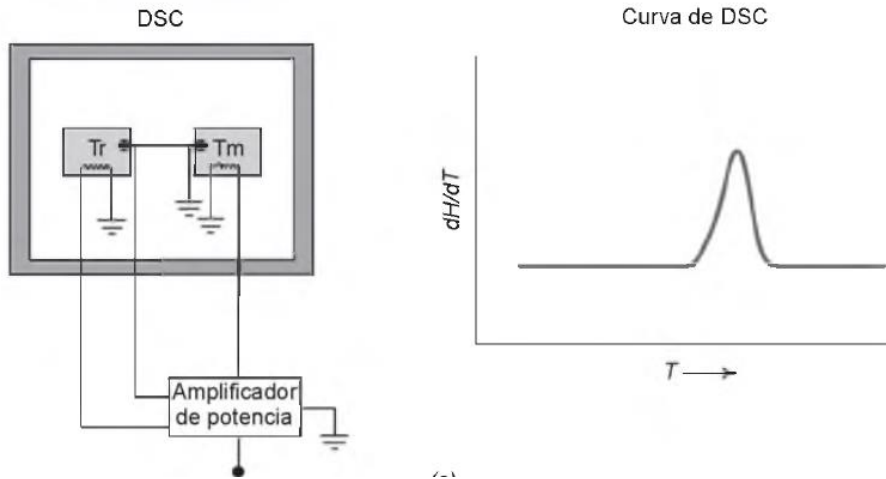
El análisis térmico se conoce como al grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la

variación de la temperatura mientras la sustancia se somete a un programa de temperatura controlado. [65]

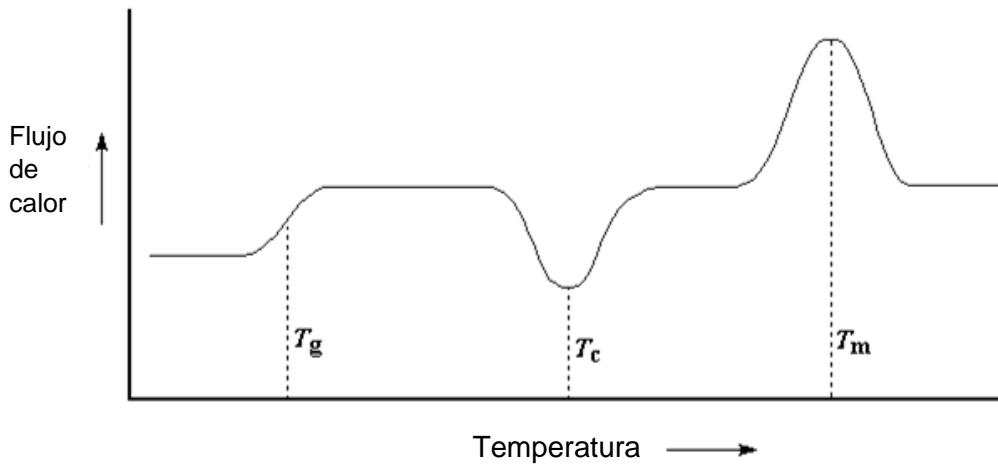
La calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés Differential Scanning Calorimetry) mide las diferencias entre la cantidad de calor absorbido o desprendido entre una sustancia y una referencia en función de la temperatura cuando ambas son sometidas a un calentamiento a velocidad constante [65].

El DSC es una herramienta analítica rápida para la identificación de numerosos compuestos y para la determinación de transiciones y diagramas de fase de los materiales. [65] El equipo de calorimetría consta de una celda en la que se produce el fenómeno térmico a estudiar y una segunda zona o bloque independiente que rodea la celda. Dependiendo de la intensidad del intercambio de calor entre dos zonas se distinguen tres tipos de calorímetros: La primera es que no hay intercambio de calor entre la celda analítica y el ambiente, por lo que la temperatura de la celda calorimétrica cambia a medida que se libera o absorbe calor. Este primer tipo es el llamado calorímetro adiabático. Si se conoce la capacidad calorífica de la celda interna y su contenido, es posible calcular la cantidad de calor producido o absorbido. Si el intercambio de calor entre la celda y el medio se mantiene a una temperatura constante y ocurre a una velocidad suficientemente rápida, la temperatura de la celda calorimétrica también permanecerá constante. El segundo tipo es el calorímetro isotérmico el cual permite evaluar el calor generado o absorbido por la fuerza de los cambios de propiedades físicas que ocurren en el medio circundante a una temperatura constante. El tercer tipo es el calorímetro de flujo de calor, en el que la celda y el medio están conectados a través de un conductor térmico. En este caso, el ambiente actúa como disipador o receptor de calor, y su temperatura, ya sea fija o variable, es controlada por un programador de temperatura proporcional-integral-derivada (PID). El flujo de calor resultante es capturado por una serie de termopares idénticos que rodean la celda y se conectan al bloque, por lo que la diferencia de temperatura en ambas áreas es mínima. El calor emite una señal que es proporcional al calor transferido por la celda por unidad de tiempo. Para eliminar los efectos de las fluctuaciones de temperatura externa en el bloque calorimétrico, generalmente se interconectan dos medidores de flujo de calor. Una de las celdas contiene el sistema en estudio y la otra sirve como referencia. En la curva DSC

los picos positivos se deben a fenómenos endotérmicos y los negativos a fenómenos exotérmicos. Se pueden obtener los datos de transición vítrea ( $T_g$ ), Temperatura de Cristalización ( $T_c$ ) y Temperatura de Fusión ( $T_m$ ). Ver figuras 9 y 10. [65]



**Figura 9** Funcionamiento DSC.

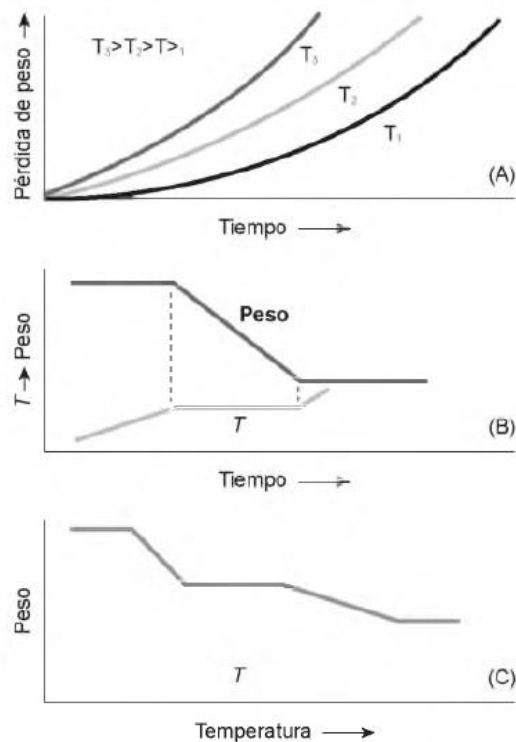


**Figura 10:** Termograma DSC

### 3.5.10 Análisis termogravimétrico (TGA)

Es una técnica que determina la pérdida o ganancia de masa en función de la temperatura. Se pueden definir 3 tipos de análisis termogravimétricos:

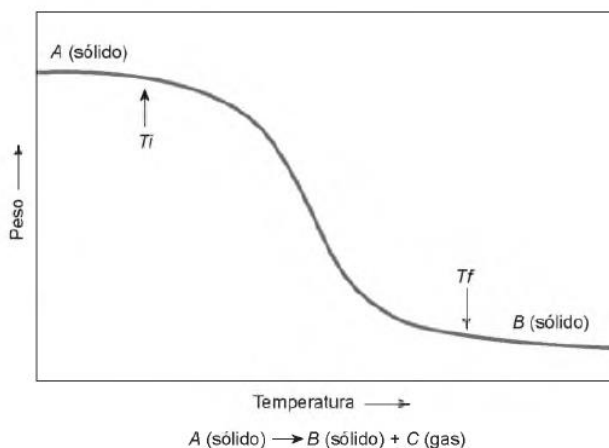
1. Análisis termogravimétrico isoterma: en el que los cambios de masa se registran a una temperatura constante (Figura 11A).
2. Análisis termogravimétrico cuasi-isoterma: en el que la muestra a analizar se calienta mientras la masa es constante y se estabiliza la temperatura mientras se van produciendo los cambios de masa (Figura 11B)
3. Análisis termogravimétrico dinámico, en el que la muestra se calienta, en una atmosfera determinada, con una rampa de temperatura controlada. (Figura 11C)



**Figura 11:** Tipos de análisis termogravimétrico

La curva que representa la variación de la masa en función de la temperatura suministra información sobre la estabilidad térmica y la composición de la muestra original, la estabilidad térmica y composición de intermedios que pueden formarse durante el análisis y de la descomposición del residuo que queda al final del mismo. En la Figura 12 se representa de forma esquemática una curva de análisis termogravimétrico de un proceso sencillo donde el sólido A se descompone en el sólido B y en el gas C, que se desprende, con una pérdida de peso  $A_M$ . La temperatura inicial (T) se define como la

temperatura a la cual se comienza a registrar la pérdida de peso, mientras que la temperatura final ( $T_f$ ) viene definida como el punto en el que alcanza la máxima pérdida de peso o, lo que es lo mismo, la temperatura a la que finaliza el proceso. Se conoce como intervalo de temperatura del proceso (AT) al rango  $T_f - T_i$ , que cuando la velocidad de calentamiento es lineal y el proceso endotérmico siempre es  $>0$  (Figura 12). De forma general se define como estabilidad térmica la propiedad de una sustancia o material de mantener sus propiedades sin cambio durante un proceso de calentamiento. El análisis termogravimétrico es una herramienta extremadamente útil para estudiar la estabilidad térmica de los materiales bajo distintas condiciones experimentales. El equipo experimental que permite realizar los análisis termogravimétricos se denomina habitualmente termobalanza. Gran parte de la información que se obtiene del análisis termogravimétrico depende de distintos factores tanto instrumentales como de la propia muestra a analizar. [65]

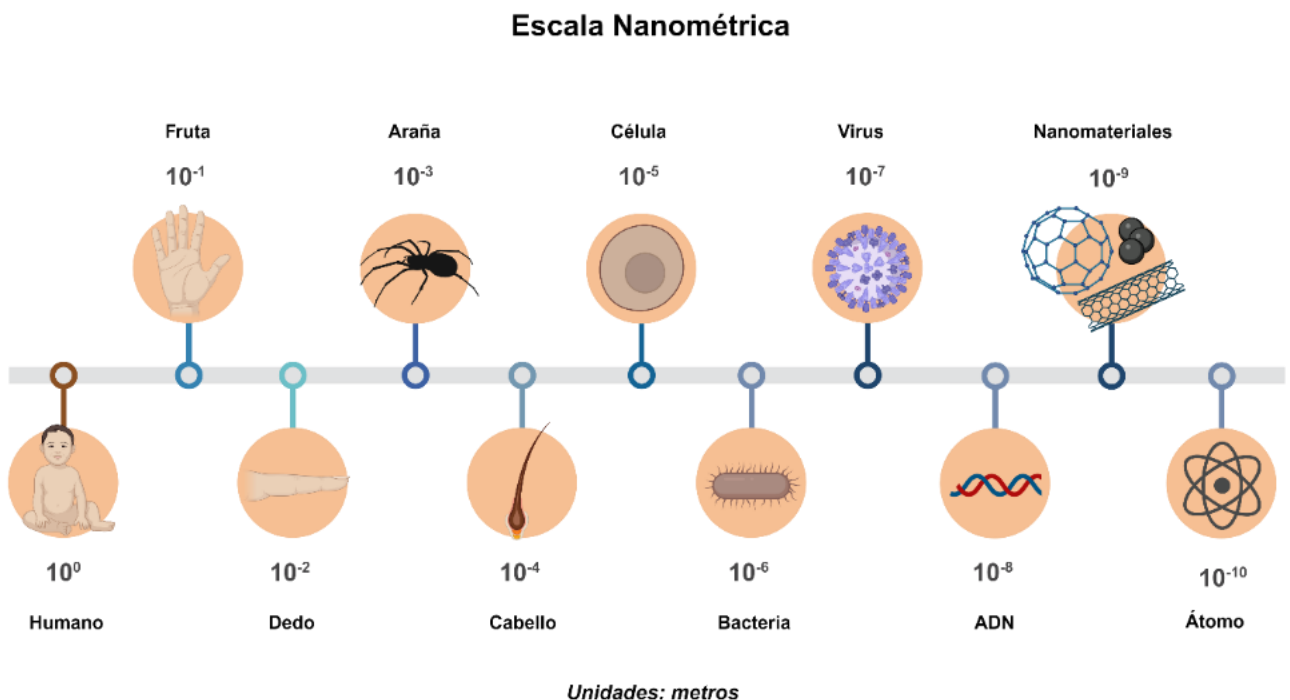


**Figura 12** Análisis termogravimétrico sencillo.

### 3.6 Nanomateriales

De acuerdo a la organización internacional de estandarización (ISO) el prefijo nano se refiere a dimensiones de entre 1 a 100 nm. Se tiene documentado que los nanomateriales se han utilizado desde hace miles de años, por ejemplo en los 2600 A.C. para dar color

a las fibras y telas, en la edad media en los cristales de las iglesias se le añadían nanopartículas de oro y plata para dar colores rojo y amarillo, de igual forma del siglo XII al XVIII se creó el hierro de damasco, el cual incluía nanohilos de cementita dentro de nanotubos de carbono, aunque todo esto se descubrió muchos años después, puesto que en esa época era imposible observar estas nanoestructuras. Richard Feynman fue el pionero en estos temas, esto lo dio a conocer el 29 de diciembre de 1959 en una conferencia llamada “There’s a plenty of room at the bottom – An invitation to enter a new field of physics” en reunión anual de la American Physical Society, en Caltech. La palabra nanotecnología fue utilizada por primera vez en 1974 por el científico Norio Taniguchi, en el maquinado y fabricación de tolerancias en semiconductores. [66] Se define a los nanomateriales como aquellos en las que sus dimensiones tienen una, o varias escalas (radio, ancho, largo) de longitudes de 1 a 100 nm ( $1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$ ) [23]. Pueden tener esta dimensión externa, estructura interna o en superficie [67]. Existen nanomateriales metálicos, poliméricos, cerámicos o compuestos. La nanoescala (ver figura 13) les da diferentes propiedades físicas y químicas a estos materiales, en comparación con el material en escala de bulto [23]. Su morfología y tamaño tienen influencia en sus propiedades y aplicaciones.



**Figura 13** Escala nanométrica con ejemplos.

### 3.6.1 Tipos de nanomateriales

Los nanomateriales se dividen en 5 categorías generales según varios factores, su tamaño, configuración, porosidad, origen y toxicidad [68], en la figura 14 se muestra detalladamente la clasificación de los nanomateriales.

1. Configuración estructural:

Esta clasificación es derivada de la fuente y estructura interna del material, aquí se clasifican en 4 tipos, orgánicos, inorgánicos, basados en carbono y compuestos [68].

2. Numero de dimensiones:

Se dividen en 4 tipos de nanomateriales según sus dimensiones: 0D son los que tienen todas sus dimensiones (X,Y,Z) a una escala menor a 100 nm [67], ejemplos de estos, son las nanopartículas y fullerenos. 1D son aquellos que tienen 2 dimensiones (X,Y) dentro de la escala nanométrica, pero una dimensión está fuera de esa escala, aquí se encuentran los nanotubos y nanofibras como ejemplo. En cuando a la clasificación 2D tiene como ejemplos a las películas delgadas, ya que estos tienen dos de sus dimensiones fuera de la escala nanométrica (Y,Z) pero una dimensión en escala nanométrica (X). Y finalmente los nanomateriales 3D son los denominados materiales bulto (bulk), estos no se encuentran en la nanoescala en ninguna de sus dimensiones, pero el material bulto está hecho de partes individuales que están en la escala nanométrica, ejemplos de estos son los grupos de nanohilos y nanotubos, coloides y nanopartículas con morfologías variadas [68].

3. Dimensión de poros:

Esta clasificación se basa en el largo del diámetro de los poros, los cuales pueden ser microporosos (diámetros menores a 2 nm), mesoporosos (diámetros mayores a 2 nm, pero menores a 50 nm) y macroporosos (diámetros mayores a 50 nm). Este diámetro determina el tamaño de las moléculas y indicando como son las propiedades de interacción, como por ejemplo si se requiere introducir alguna molécula a los poros, si esta es de menor dimensión que el poro, habrá una menor

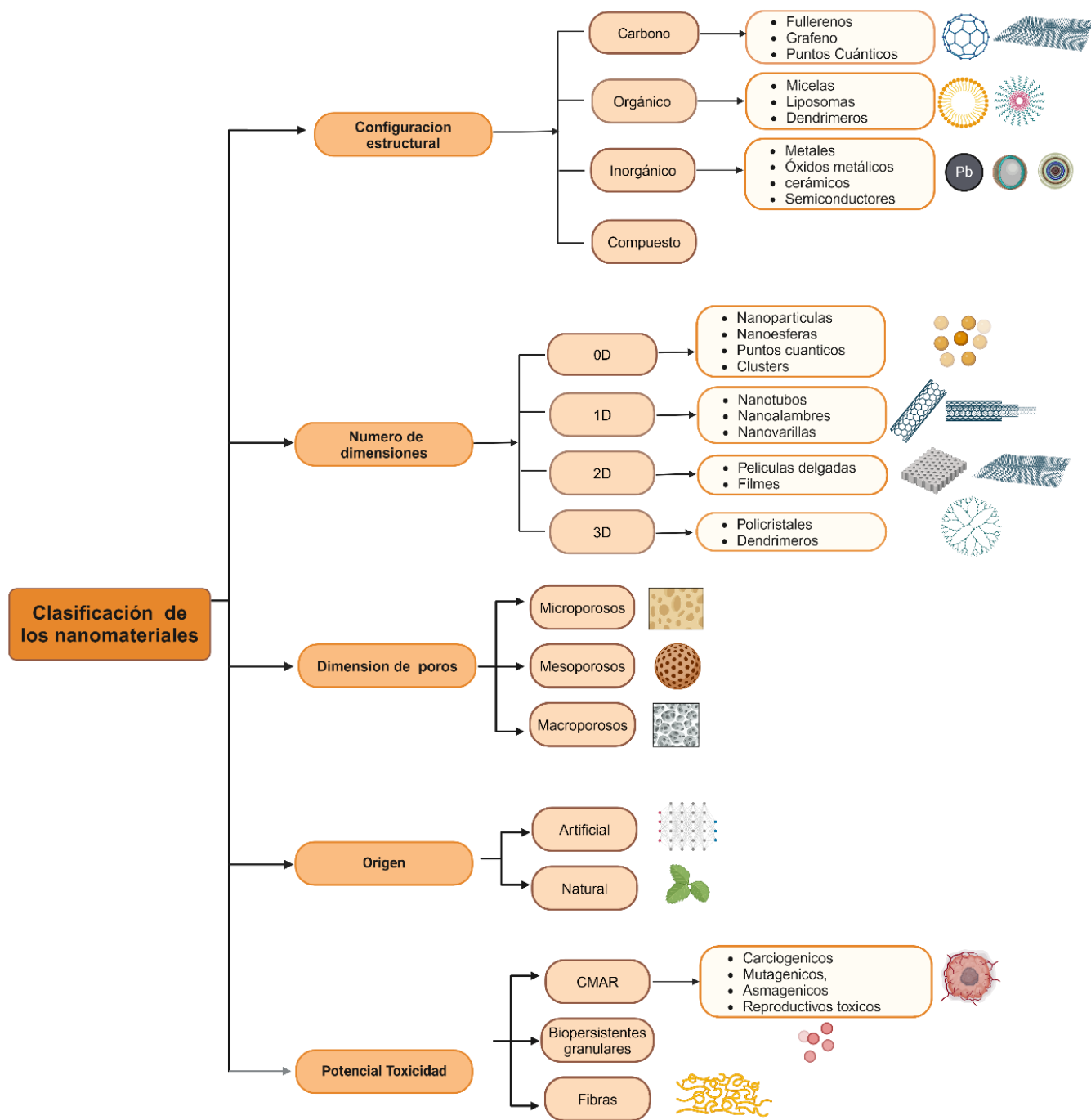
interacción entre la pared del poro y la molécula durante el proceso de difusión [68].

#### 4. Origen:

Existen dos tipos de nanomateriales de acuerdo a su origen, los naturales o antropogénicos, las fuentes principales de estos, incluyen a volcanes en erupción, el mar, incendios forestales, tormentas de arena, la tierra y la arcilla, y algunos minerales (magnetita y ferrita), algunos otros provienen de seres vivos como la hidroxiapatita (dientes y huesos), los lípidos y carbohidratos las dimensiones que estos pueden tener va de los 10 nm a 1  $\mu\text{m}$ . Los nanomateriales de origen sintético son los que son manufacturados utilizando gran cantidad de compuestos químicos, como los metales, semiconductores, óxidos metálicos, carbono y polímeros, su morfología puede ser diseñada a gusto y pueden ser en forma de esferas, alambres, fibras, agujas, tubos, caparazones, anillos, toroides, películas entre otros, y esto hace que tengan funciones especiales según la aplicación que se le quiera dar son los que se realizan en el laboratorio por diversos métodos, estos incluyen a los que provienen de metales, óxidos metálicos [66] y los puntos cuánticos [67].

#### 5. Potencial toxicidad:

En este rubro existen 3 grupos de nanomateriales basados en su toxicidad: las fibras las cuales son rígidas y biopermanentes, entre ellas se encuentran las de óxidos metálicos y los nanotubos de carbono, con un límite de exposición de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  fibras/ $\text{m}^3$ , las partículas bioresistentes que tienen límites de exposición para nanopartículas de  $2 \times 10^7$  partículas/ $\text{m}^3$ , como ejemplos están oro, plata, cobalto, plomo, hierro, lantano, óxidos de hierro, cerio, antimonio y estaño. Por último, están las nanopartículas CMAR (carcinogénicas, mutagénicas, asma génicas y toxinas reproductivas) las cuales incluyen las nanopartículas de níquel, cadmio, cromo, berilio, arsénico y cromato de zinc, su exposición tiene de limite  $2 \times 10^7$  partículas/ $\text{m}^3$  [68]



**Figura 14:** Clasificación general de los nanomateriales.

### 3.7 Síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de nanopartículas existen dos métodos generales, el primero es el método llamado Top-Down (de arriba hacia abajo) este inicia con una molécula o material en escala macro o de bulto y se descompone o degrada hasta hacerlo en unidades más pequeñas convirtiéndolas finalmente en NPs, los métodos convencionales utilizados son la molienda mecánica, ablación laser, sputtering y secado por spray. El segundo es el método Bottom-Up (de abajo hacia arriba) el cual tiene el enfoque a la inversa, formando nanopartículas a partir de sustancias o compuestos simples [69], involucrando la construcción de las NPs desde los átomos hasta formar clústeres de estas, los métodos utilizados comúnmente son la síntesis química húmeda, micro emulsión, sol-gel, deposición de vapor y la síntesis biológica o verde (bacterias, hongos, algas o plantas). [68] Ver figura 15. El método de bottom-up es el más utilizado para la producción industrial de nanomateriales. [66] La síntesis química húmeda es una de las más prácticas, fáciles y baratas para crear nanopartículas, se utilizan reactivos orgánicos e inorgánicos, divididos en precursores (sales metálicas), reductores (reactivos que reducen el elemento deseado a 0) y estabilizantes (previenen la aglomeración de las NPs evitando la repulsión electrostática, recubriendo su superficie.[70]

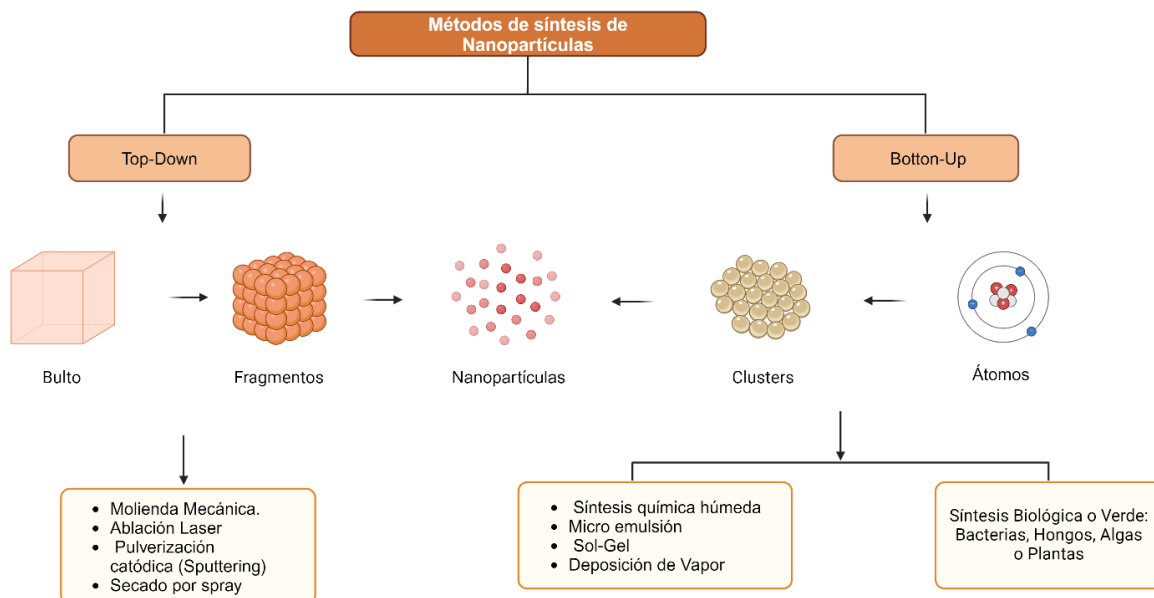


Figura 15 Clasificación de los métodos de síntesis de NPs.

### 3.8 Técnicas de caracterización de nanopartículas

Las técnicas de caracterización de NPs son de suma importancia para conocer las propiedades de las NPs, ya que proveen de técnicas que analizan tanto las propiedades, físicas como químicas de estos materiales. En la tabla 4 se muestra la técnica de caracterización en función de las propiedades del material [71].

**Tabla 3** Técnicas de caracterización utilizadas para caracterización de nanopartículas.

Propiedad	Técnica de caracterización
Tamaño de partícula / Área de superficie	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dispersión de luz dinámica (DLS; por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering)</li></ul>
Composición de superficie	<ul style="list-style-type: none"><li>• Energía dispersiva de rayos X (EDX; por sus siglas en inglés Energy Dispersive X-Ray analysis)</li><li>• Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR; por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy)</li><li>• Espectroscopia visible Ultravioleta (UV-Vis; por sus siglas en inglés Ultraviolet Visible Spectroscopy)</li></ul>
Morfología	<ul style="list-style-type: none"><li>• Microscopia electrónica de barrido (SEM; por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy)</li><li>• Microscopia de Fuerza Atómica (AFM; por sus siglas en inglés Atomic Force Microscopy)</li></ul>
Antimicrobianas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Difusión en agar</li></ul>

#### 3.8.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Esta técnica se utiliza cuando se requiere caracterizar soluciones coloidales y NPs, la luz dispersada por un láser que viaja a través de la solución coloidal es medida por esta técnica, la modulación de la intensidad de la luz dispersada se analiza en función de tiempo, y de esta información obtenemos el tamaño de la partícula. El análisis se basa en el movimiento browniano, en el que las partículas grandes se mueven más lento y dispersan más luz que las partículas pequeñas. El diámetro de una esfera hipotética no porosa que puede difundirse a la misma velocidad que la de las partículas caracterizado

se denomina diámetro hidrodinámico y se calcula dependiendo del tiempo de la medición de la intensidad de dispersión. También, proporciona detalles sobre el estado de agregación de las NPs, así como el potencial Z de la solución. Este se define como una medida de la carga eléctrica efectiva en la superficie de la nanopartícula y cuantifica la estabilidad de carga de las partículas coloidales. Cuando una nanopartícula tiene una carga superficial, la carga es protegida por una mayor concentración de sustancias opuestas o iones cargados cerca de la superficie de la nanopartícula. La capa de iones se mueve junto con la nanopartícula, y se forma una doble capa eléctrica, que es la capa de superficie carga y los iones con carga opuesta. La diferencia de potencial de la capa fluida que contiene iones con cargas opuestas y un fluido grande en el que la partícula está suspendida es el potencial zeta. Las partículas con potencial zeta negativo se unirán a las superficies cargadas positivamente y viceversa. La magnitud del potencial zeta proporciona información sobre la estabilidad de las NPs. Las NPs con potencial zeta negativo se unirán a las superficies cargadas positivamente y viceversa. La magnitud más alta representa mayor estabilidad debido al aumento de la repulsión electrostática. Cuando las NPs tienden a agregarse están en el rango de 0 a 5 mV. Aquellas que tienen una mínima estabilidad se encuentran en el rango de 5 a 20 mV, las moderadamente estables se encuentran en el rango de 20 a 40 mV, y finalmente las que están altamente estables están en el rango de 40+ mV. [71] La concentración de la solución, la estabilidad coloidal, el pH y el recubrimiento que tenga la nanopartícula tiene influencia en los resultados que se obtendrán por esta técnica, es por eso que se utiliza al inicio de cualquier tipo de caracterización morfológica, dependiendo el resultado se hace comparativo con las técnicas de AFM y SEM. [72] La figura muestra un equipo de DLS.



**Figura 16** Equipo de medición DLS.

### **3.8.2 Espectrómetro de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDS)**

Esta técnica proporciona un mapeo general de la muestra mediante el análisis de elementos químicos en la superficie y estima la proporción elemental en diferentes posiciones. Esta técnica se utiliza con el SEM. Un haz de electrones con una energía de 10 a 20 keV golpea la superficie conductora de la muestra, provocando que el material emita rayos X, energía que es propia del material que se está analizando. Se puede estimar la composición o cantidad de nanopartículas cerca y en la superficie, sin embargo, los elementos de número atómico bajo son difíciles de detectar mediante EDS [71]

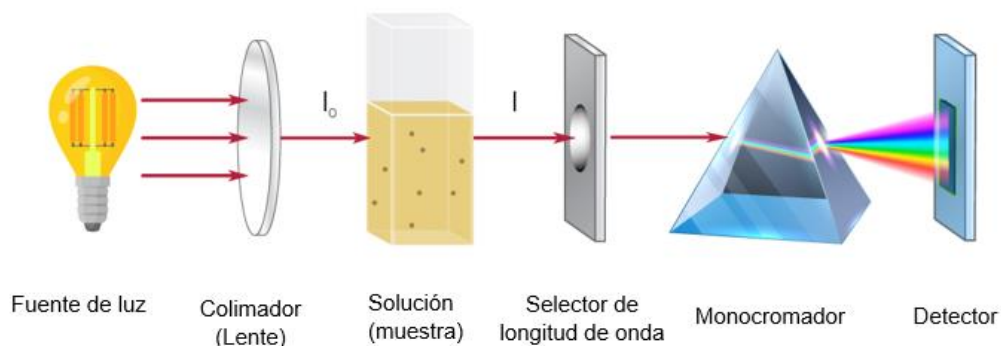
### **3.8.3 Espectroscopia infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)**

El análisis FTIR se utiliza para la identificación de materiales principalmente orgánicos, algunos inorgánicos y poliméricos en el rango de longitud de onda infrarroja para escanear las muestras. Las alteraciones en el patrón de las bandas de absorción indican claramente un cambio en la composición del material. Esta técnica es útil para identificar y caracterizar materiales desconocidos y/o detectar contaminantes, así como cualquier otro tipo de compuesto que este en la muestra. El espectrofotómetro FTIR típico incluye una fuente, una celda de muestra, un detector, un amplificador, un convertidor A/D y una computadora. La radiación de las fuentes llega al detector después de pasar por el interferómetro, esta señal es amplificada y convertida a una señal digital por el convertidor y amplificador A/D, después la señal se transfiere a la computadora donde se realiza la transformada de Fourier. Se envía radiación infrarroja de aproximadamente  $10,000$  a  $100\text{ cm}^{-1}$  a través de la muestra con parte de la radiación absorbida y parte que la atraviesa. La radiación que absorbe la muestra la convierte en energía vibratoria o rotacional. La señal resultante obtenida en el detector es un espectro generalmente de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , que representa la huella molecular de las muestras. Cada molécula tiene una huella digital única, lo que hace que FTIR sea una herramienta invaluable para la identificación química. [71]

### 3.8.4 Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis es una técnica ampliamente utilizada que proporciona una evaluación no invasiva y rápida en tiempo real de distintas propiedades como es el tamaño, concentración y estado de agregación en nanomateriales. Además, es un proceso simple y económico que utiliza una muestra mínima de preparación, lo que hace de esta técnica una herramienta esencial para el estudio de nanomateriales.<sup>[73]</sup> Esta técnica de caracterización se utiliza para cuantificar la luz que es absorbida y dispersada por una muestra que se coloca entre una fuente de luz y un fotodetector, para medir la intensidad de un haz de luz antes y después de pasar por esta. Estas mediciones se comparan en cada longitud de onda para cuantificar el espectro de extinción dependiente de la longitud de onda de la muestra. Los datos se representan como extinción en función de la longitud de onda y se corrigen con respecto a un “blanco” o medio de dispersión para garantizar que las características espectrales del disolvente no están incluidas en el espectro de la muestra. <sup>[74]</sup>

El espectro indica la reflectancia o absorbancia de la región del espectro visible ultravioleta. Cuando el haz pasa a través de la solución, parte de la luz puede ser absorbida, y el resto será transmitida a través de la solución. La proporción de luz que entra en la muestra respecto de la luz que sale de la muestra a una longitud de onda fija se llama transmitancia. El logaritmo negativo de la transmitancia se llama absorbancia. <sup>[71]</sup> (figura 17)



**Figura 17:** Espectroscopia UV-Vis

### 3.8.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que se utiliza para examinar y registrar la topografía de la superficie de una muestra a una resolución significativamente mayor que la posible por microscopía de luz, es un instrumento versátil y da información estructural y morfológica de diferentes tipos de muestras, entre ellos los nanomateriales [75], en la Figura 18 se muestra un esquema del SEM.

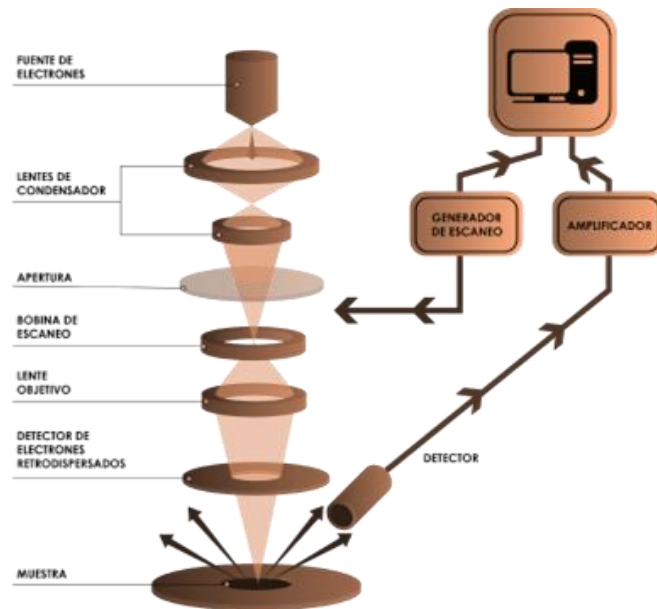


Figura 18 Microscopio Electrónico de Barrido.

### 3.8.6 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) es una tecnología versátil y poderosa de caracterización que se usa para estudiar superficies de muestras a nanoescala. Se obtienen imágenes en tres dimensiones de la topografía de la muestra, dándonos diferentes tipos de mediciones de superficie. La técnica de AFM puede generar imágenes en resolución atómica (Angstrom), puede obtener información de altura, rugosidad, textura y morfología de superficies y representarlas en 3 dimensiones. La preparación de las muestras es muy sencilla. El AFM utiliza un cantiléver con una punta fina para escanear las muestras (ver figura 19). Aunque el cantiléver se acerca a la

superficie de manera que la punta entre en contacto con él, las fuerzas repulsivas son mayores y el cantiléver se desvía de la superficie [71].

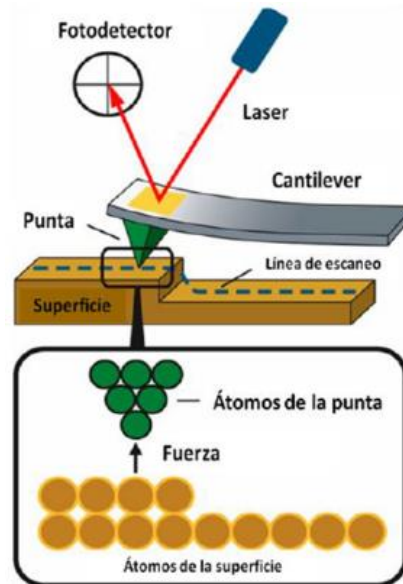


Figura 19. Microscopio de fuerza atómica (AFM)

### 3.8.7 Análisis microbiológico

Para analizar la actividad antimicrobiana de NPs, se pueden aplicar distintas técnicas microbiológicas, una de las más comunes es la difusión en agar. Este método es utilizado para analizar el crecimiento común de microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras de manera rápida. La figura 20 muestra una secuencia de los principales pasos de este método. El primer paso es inocular el microorganismo en una caja Petri que contenga un medio de cultivo de crecimiento, posteriormente se coloca la muestra del material a analizar en la superficie del agar, y se esparce por toda la caja Petri para que haya una distribución homogénea en toda la caja Petri, terminando esto el contenido se incuba en condiciones óptimas de crecimiento para los microorganismos. Una vez pasado el tiempo, se observa el crecimiento de los microorganismos, si el agente antimicrobiano analizado impide el crecimiento cerca de su área, a eso se le llama zona de inhibición. Para la medición de las zonas de inhibición se utiliza métodos estandarizados, primero se mide el radio de la zona con un vernier y posteriormente se

correlaciona con la mínima concentración inhibitoria del agente antibacteriano para obtener resultados confiables [76].



**Figura 20** Difusión en Agar.

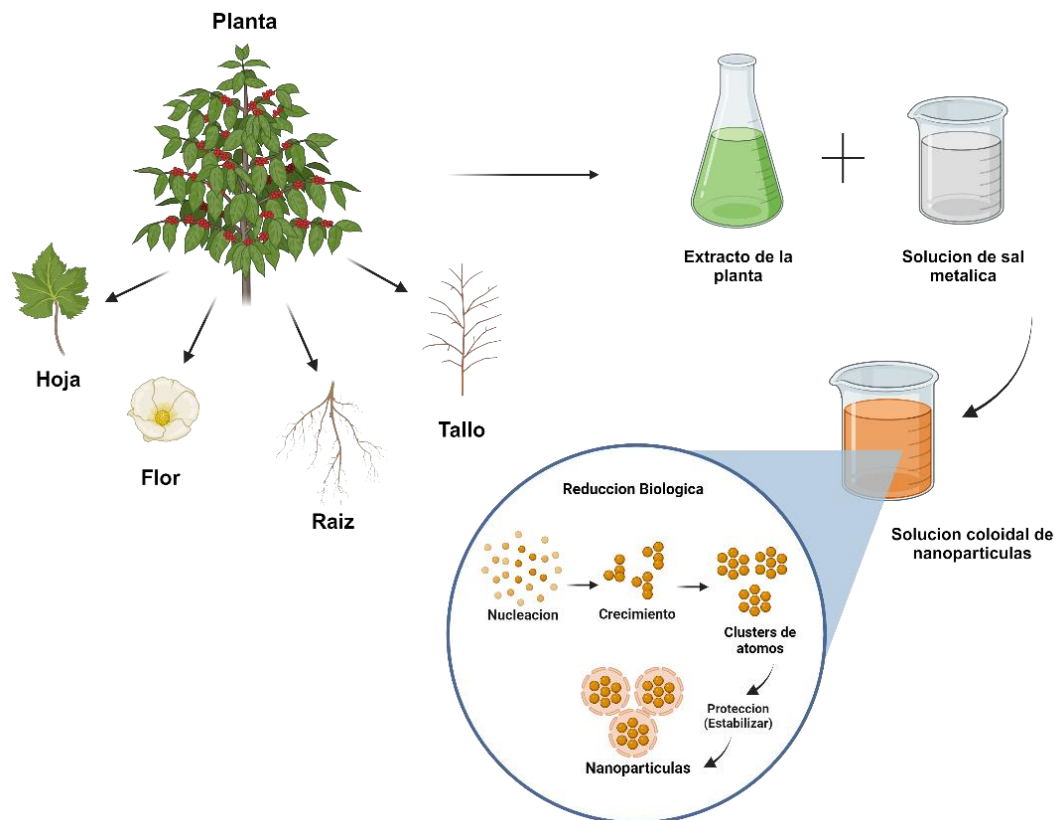
### 3.9 Síntesis verde de nanopartículas

La síntesis de nanomateriales empleando el método “verde” es una alternativa que hoy en día se ha estado implementando gracias a su compatibilidad con el medio ambiente, ya que no se utilizan compuestos químicos tóxicos, tiene un procedimiento más sencillo de realizar y tiene un menor costo comparado con los otros métodos. Los agentes precursores son sales metálicas, y para su reducción y estabilización se pueden utilizar bacterias, hongos, algas y/o extractos acuosos o no acuosos de plantas [77]. Las NPs sintetizadas por ruta verde tienen distintas propiedades, que las convierten en una buena opción para aplicaciones biomédicas. [68]

#### 3.9.1 El uso de plantas para la síntesis de nanopartículas

Las plantas son una buena elección para la síntesis y producción de NPs metálicas y no metálicas, se utilizan extractos acuosos y/o no acuosos de las partes de la planta (hojas, tallo, raíz y fruto) según se requiera. Los extractos de la planta contienen metabolitos secundarios que funcionan como agentes reductores y/o estabilizantes de las nanopartículas, la forma y tamaño de las NPS depende mucho del tipo de metabolito que está trabajando como reductor y/o estabilizante, la cantidad que se le añade, así como

la temperatura a la que se está realizando la síntesis del material (Ver figura 21). [78] Los fitocompuestos encontrados que comúnmente funcionan bien como agentes reductores y estabilizantes son los fenoles, flavonas, ácidos orgánicos y las antraquinonas. [68]



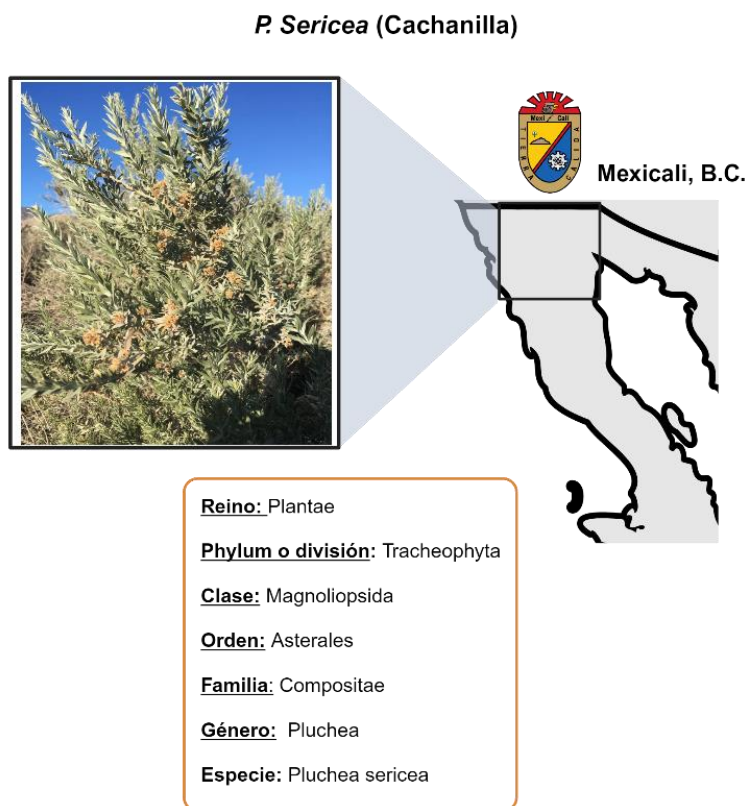
**Figura 21** Síntesis verde de NPs utilizando extractos de plantas.

### 3.10 La planta *Pluchea Sericea* (Cachanilla)

Esta planta pertenece al género *Pluchea* (Asteraceae, Plucheeae), el cual se distribuye comúnmente en regiones calurosas en América, África, Asia y Oceanía, específicamente en México se registran 9 especies, de las cuales 2 de ellas son catalogadas como endémicas [79].

Entre estas 9 especies se encuentra *Pluchea Sericea* (*P. Sericea*) o comúnmente conocida como “Cachanilla”, la cual es común que crezca en tierras áridas donde comúnmente llueve pocas veces al año, junto a canales de agua, suelos salinos y

arenosos en los desiertos de Baja California, Sonora y Chihuahua [80]. Es un arbusto silvestre de color verde opaco o café cenizo, de hojas alargadas y pequeñas, de aproximadamente 2 a 3 cm de largo y 6 mm de ancho, que están cubiertas por pequeños filamentos sumamente finos (Figura 22) [79,81] .



**Figura 22** Ubicación geográfica y taxonomía de la planta *P. Sericea* (Cachanilla).

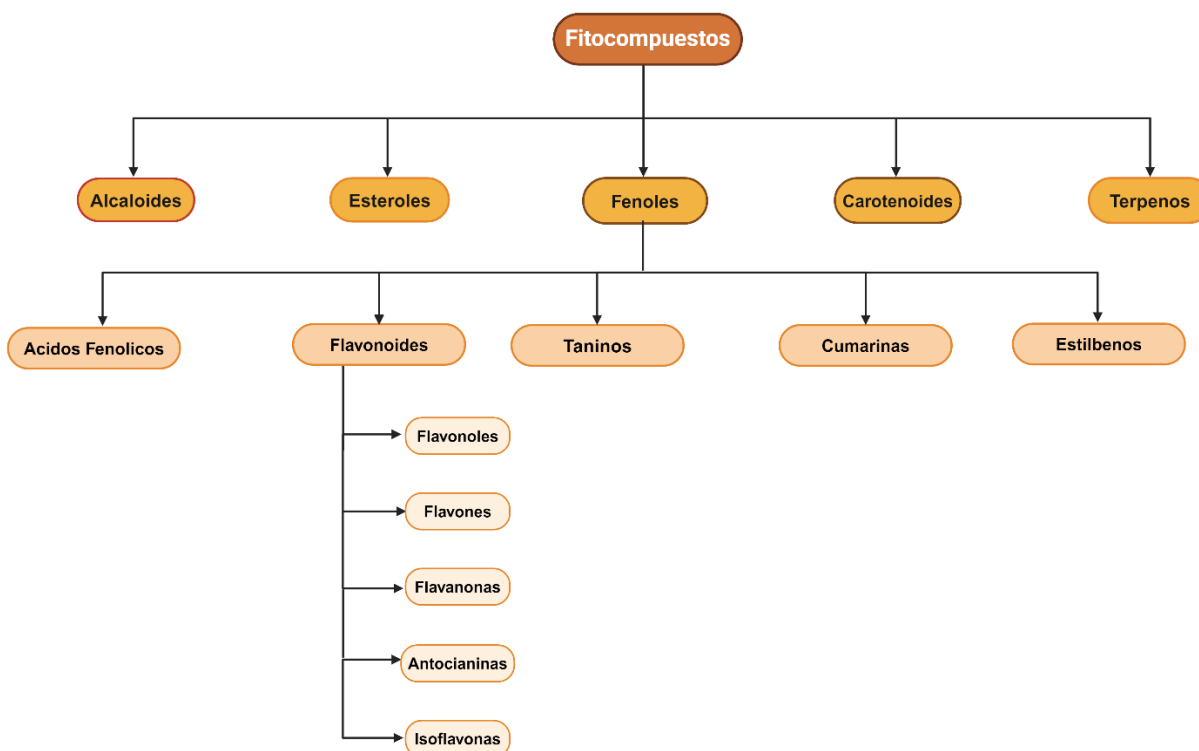
### 3.11 Metabolitos secundarios y sus propiedades biológicas

Las plantas son seres vivos autótrofos que por medio de la fotosíntesis transforman la energía solar en energía bioquímica (como la glucosa), obteniendo así una variedad de nutrientes y compuestos químicos, convirtiendo a algunas plantas base de la pirámide alimenticia, dado esto, las plantas son consumidas por todo tipo de organismos vivos, poniéndolas en un contexto de supervivencia, generando mecanismos de defensa para evitar ser consumidas (en el caso de las plantas no comestibles) y así poder seguir subsistiendo en el ambiente donde están. Es por eso que generan diversas moléculas

orgánicas llamadas fitocompuestos o metabolitos secundarios los cuales difieren en el metabolismo primario de las plantas (metabolitos primarios) que son la base del sistema de las plantas (fotosíntesis, respiración y transporte de nutrientes) [82].

La fitoquímica o química de las plantas analiza la composición estructural, las rutas biosintéticas, mecanismos y funciones en el sistema de la planta y como las protege, así como en que podríamos utilizarlos en la vida, se aplica en el área médica, cosmética, alimenticia, industrial entre otras [83].

Los fitocompuestos o metabolitos secundarios (figura 23), son compuestos químicos derivados de plantas, estos metabolitos son sintetizados para proteger a la planta como método de defensa contra mamíferos, ovíparos, insectos, exposición UV y peligros ambientales. Los fitocompuestos son diferentes a los nutrientes esenciales (metabolitos primarios) como por ejemplo los carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas que son de vital importancia para la vida de las plantas [83].



**Figura 23** Clasificación general de los fitocompuestos.

### 3.11.1 Extracción y caracterización de metabolitos secundarios

Durante la extracción de fitocompuestos existen varios factores a considerar, los cuales incluyen la procedencia de la planta y el contexto en el que creció, la parte de la planta (tallo, hojas, flor o raíz), el tipo de solvente utilizado, la cantidad, la temperatura aplicada y el tiempo de extracción aplicado. Uno de los factores más importantes es la elección correcta del solvente, su volatilidad, toxicidad, corrosividad, viscosidad, estabilidad química y el costo. Una buena elección de solvente sería aquel que tiene una volatilidad alta para que pueda ser fácilmente removido del extracto, también se debe considerar la baja corrosividad para que el extracto resultante no cuente con residuos tóxicos, otro factor muy importante a tomar es la solubilidad de los fitocompuestos en el solvente, debe tener un bajo punto de fusión comparado con el soluto para poder separarlos con mayor facilidad. Entre los solventes más utilizados dependiendo el fitocompuesto buscado se encuentran el agua (antocianinas, almidón, taninos, saponinas, terpenoides y polipéptidos), el etanol (taninos, polifenoles, flavonoles, terpenoides y alcaloides, estereoides y alcaloides), el metanol (antocianinas, terpenoides, saponinas, taninos, flavones y polifenoles), el cloroformo (terpenoides y flavonoides), el éter (alcaloides, terpenoides, cumarinas y ácidos grasos) y la acetona (fenoles y flavonoles) [84].

Las plantas deben ser tratadas previamente para su extracción, se sugiere que sea lavada perfectamente con agua y jabón, posteriormente se debe desinfectar para evitar cualquier tipo de contaminante, se debe secar perfectamente ya sea natural o artificialmente (hornos de aire) y finalmente triturar la planta hasta obtener un polvo, esto para que la extracción sea de mayor calidad. [85]

### 3.11.2 Métodos de extracción y separación

1. Homogenización: Este es el método más utilizado de todos, en él se utiliza la planta seca y triturada y se deposita en un contenedor de vidrio con una cantidad de solvente apropiado y se deja macerar de 24 a 48 horas, mientras tanto se debe

agitar ocasionalmente o si es posible tenerlo en agitación constante, finalmente se obtiene el extracto por medio de filtración. [85]

2. Extracción exhaustiva en serie: Para este método se utilizan una variedad de solventes, desde los no polares (hexano) hasta los polares (metanol) dependiendo el compuesto que se requiera extraer. Una desventaja es que no se pueden utilizar temperaturas altas por que origina degradación del extracto. [85]
3. Extracción por Soxhlet: Se utiliza cuando el compuesto es menos soluble que el solvente y las impurezas son muy solubles en el solvente. Cuando el compuesto deseado es muy soluble en el solvente las impurezas pueden ser eliminadas con filtración simple, la ventaja de este método es que el solvente puede volver a ser utilizado. En este método no se recomienda utilizar altas temperaturas. [85]
4. Maceración: Es el método en el cual la planta triturada o en polvo se mantiene en el solvente por un determinado periodo de tiempo con agitación constante sin aplicación de temperatura. El extracto puede ser obtenido por medio de filtración [85].
5. Decocción: La aplicación de altas temperaturas según corresponda (puede llegar al punto de ebullición) es utilizada en este método cuando se tienen compuestos solubles en agua. Se deja una determinada cantidad de tiempo, se deja enfriar y se filtra para obtener el extracto [86].
6. Infusión: En este método las plantas son maceradas con agua fría o agua caliente según convenga, por un tiempo determinado, y posteriormente se obtiene el extracto por medio de filtración [86].
7. Digestión: Se maceran las plantas con una baja temperatura de calentamiento [86].
8. Sonicación: En este método se utiliza tecnología ultrasónica para extraer los fitocompuestos bajo frecuencias en rangos desde los 20 kHz a 2000 kHz. La sonicación permite la ruptura de la pared de la célula de la planta obteniendo así los compuestos deseados [85].
9. Extracción asistida por microondas: Se utiliza radiación de microondas y solventes para la extracción de los fitocompuestos, la energía del microondas calienta los solventes incrementando la energía cinética, obteniendo humedad en las células

de la planta, obteniendo evaporación y exudación para la obtención del extracto [86].

### 3.11.3 Análisis cualitativo (Barrido fitoquímico)

Para la identificación cualitativa de metabolitos primarios y secundarios en las plantas se utiliza el barrido fitoquímico, el cual consta de la utilización de reactivos químicos específicos que reaccionan con el extracto de la planta, estas reacciones nos dirán si existe o no el fitocompuesto buscado [85–87]. Ver tabla 5.

**Tabla 4:** Técnicas de identificación cualitativa para metabolitos en plantas.

Metabolito buscado	Prueba	Procedimiento
<b>Almidón</b>	Lugol	Se añade solución de Lugol al extracto, el resultado es positivo si se obtiene un color azul.
<b>Alcaloides</b>	Wagner	Se añade solución Wagner (Yodo-Potasio) al extracto acuoso, el resultado es positivo si se forma un precipitado rojizo-café.
<b>Glucósidos</b>	Borntranger	Se añade una pequeña cantidad de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) al extracto, se agita vigorosamente, y posteriormente se le añaden gotas de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), si la reacción toma un color rosa, el resultado es positivo.
<b>Fenoles</b>	Bayer	Al extracto se le añaden gotas de solución al 1% de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) si se obtiene una coloración, roja, azul o morada, el resultado es positivo.
<b>Taninos</b>	$\text{FeCl}_3$	Se añaden gotas de solución al 5% wt de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al extracto, si un color verde oscuro se presenta, el resultado es positivo.
<b>Flavonoides</b>	$\text{H}_2\text{SO}_4$	Al añadir gotas de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado al extracto de la planta, el resultado es positivo si un color naranja se presenta.
<b>Esteroides</b>	Salkowski	Se añaden cantidades iguales de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al extracto, si aparece un color rojizo o verde, el resultado es positivo.
<b>Terpenoides</b>	$\text{CHCl}_3$ / $\text{H}_2\text{SO}_4$	Al extracto acuoso se le añade una menor cantidad de cloroformo que de ácido sulfúrico concentrado, si se forma un color café rojizo, en la interfase de las soluciones, tenemos un resultado positivo.

<b>Antocianinas</b>	HCl	Se añaden gotas de solución 2N de HCl y posteriormente gotas de amoniaco, si se tienen colores rojo-rosa o azul-violeta indica un resultado positivo.
<b>Cumarinas</b>	NaOH	Se añade una pequeña cantidad de solución al 10% wt de hidróxido de sodio (NaOH) al extracto de la planta, si este cambia a color amarillo, el resultado es positivo.
<b>Saponinas</b>	Espuma	Se agita vigorosamente el extracto acuoso de la planta, si se obtiene una espuma blanca y esta dura más de 30 segundos, y es estable, el resultado es positivo.

### 3.12 Selenio

El selenio es un elemento de la tabla periódica clasificado como un no metal, con símbolo Se, fue descubierto por el científico Jöns Jakob Berzelius en 1817, cuando experimentaba en la producción de ácido sulfúrico, y fue nombrado así por la palabra Selene que viene del latín y significa “luna”. Por muchos años fue considerado un elemento toxico, y fue en el año 1930 cuando se identificaron grandes cantidades de selenio en las plantas, hoy en día existen numerosas investigaciones que indican que muchos alimentos contienen trazas de selenio <sup>[88]</sup>. El selenio es un micronutriente esencial en el metabolismo de animales y humanos, ya que tiene funciones antioxidantes e incrementa el sistema inmune <sup>[89]</sup>, también es necesario para regular funciones fisiológicas y bioquímicas así como reacciones enzimáticas. <sup>[90]</sup>. La ingesta diaria adecuada para un adulto debe ser en promedio es de 300 µg, sin embargo es toxico si sobrepasa los 950 µg <sup>[89]</sup>. El selenio elemental tiene gran importancia en las áreas de la física, química y la biología, este elemento existe en dos formas: la inorgánica (selenito y selenato) y la orgánica (selenometionina y selenocisteina), también existe en forma amorfa y policristalina, tiene una estructura monoclinica (m-Se y es de color rojo) y trigonal (t-Se y es de color negro) y es la estructura cristalina más estable a temperatura ambiente<sup>[91]</sup>. La aplicación de selenio en forma de nanopartículas es una opción viable en la industria del empaque alimenticio <sup>[92]</sup>, gracias a sus propiedades antimicrobianas y por su baja toxicidad <sup>[93]</sup>.

### 3.12.1 Síntesis verde de nanopartículas de selenio

El selenio en su forma nanométrica tiene propiedades muy distintas a su tamaño de bulto [94], la aplicación de SeNPs está siendo estudiada y aplicada en diferentes áreas como la medicina, biomateriales, industria electrónica, de energías [89] y de empaque alimenticio [95]. Existen diferentes técnicas para sintetizar SeNPs, entre ellas están las físicas (ablación laser, radiación UV y técnicas hidrotermales), las químicas (reducción química, sol-gel y pirolisis) y las biológicas o verdes (bacterias, hongos, algas y extractos de plantas). [96] Las técnicas más utilizadas para la síntesis de SeNPs es la síntesis química húmeda, utilizando la reducción química de formas inorgánicas de selenio como precursores (selenito de sodio  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , ácido selenioso  $\text{H}_2\text{SeO}_3$ , utilizando agentes reductores como glucosa, fructosa, cisteína y meta sulfito de sodio y estabilizándolas con polímeros solubles en agua y polisacáridos naturales como la carboximetilcelulosa o albumina. Sin embargo, el uso de estos reactivos reductores y estabilizantes dejan residuos químicos que limitan las aplicaciones de las SeNPs en biomateriales, y biomedicina. Por lo tanto la aplicación de extractos de plantas para la síntesis verde de SeNPs es una forma segura, barata y amigable, es posible utilizar desde los tallos, hojas, raíces, flores, frutas, vegetales por medio de extractos acuosos [96], específicamente para el selenio, se ha encontrado que los fitocompuestos que han fungido mejor como agentes reductores y estabilizantes en comparación con otros son los polifenoles, flavonoides, alcaloides, polisacáridos y saponinas. De las plantas más utilizadas para la síntesis de SeNPs se encuentran el limón, las cascaras de naranja y Aloe vera [94].

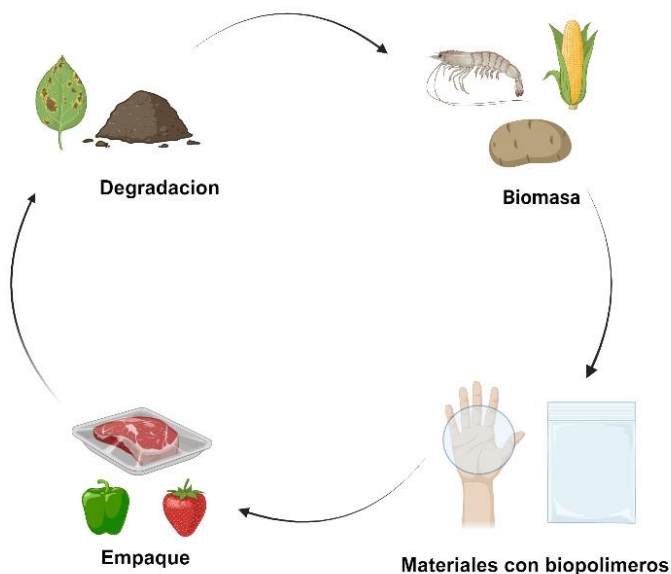
### 3.13 Empaque alimenticio

Se define como empaque alimenticio a los materiales que se utilizan para contener, proteger, maniobrar y/o transportar alimentos [97]. Es la última etapa de la producción de productos de la agricultura después de que son transportados y presentados a los consumidores. El empaque alimenticio es el responsable de tener a los alimentos listos para su transporte, distribución, almacenamiento, venta y uso final de calidad para el consumidor, a un costo bajo. También, tiene como función preservar y proteger lo más

posible los alimentos, evitando que se degraden fácilmente por contaminación física, química o biológica [97], como gases, humedad, polvo, olores, microorganismos (hongos, virus y bacterias) [98]. Se le considera como la ciencia, el arte y la tecnología de preparar los productos alimenticios para el mercado. Los materiales usualmente utilizados son el aluminio, madera, vidrio, papel y plástico [99]. El empaque alimenticio debe cumplir con altos estándares de calidad y debe ser regulado por normas gubernamentales [97]. Sin el empaque alimenticio el manejo de los materiales sería muy difícil, inconveniente, ineficiente y caro, afectando la calidad del producto y ocasionando una experiencia negativa en el consumidor final [98].

### 3.14 Biopolímeros utilizados en empaque alimenticio

Los biopolímeros utilizados en empaque alimenticio se definen como materiales biobasados y biodegradables que protegen y alargan la vida de los alimentos [100]. Gracias a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes son considerados amigables con el medio ambiente.[101] Al utilizar biopolímeros para estos fines, se trae la idea de que el ciclo natural de la materia orgánica se lleve a cabo. En la figura 24 se observa el ciclo de vida de un material a base de biopolímeros para aplicaciones de recubrimiento y/o empaque alimenticio [100].



**Figura 24** Ciclo de vida de los materiales a base de biopolímeros.

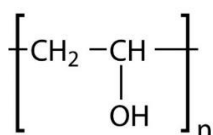
En la tabla 6 se muestran los biopolímeros comúnmente utilizados para empaque alimenticio <sup>[102]</sup>.

**Tabla 5:** Tipos de biopolímeros utilizados en empaque alimenticio.

Polisacáridos	Proteínas	Sintéticos
Alginato	Colágeno	Ácido Poliláctico (PLA)
Carragenina	Gelatina	Polihidroxitirato (PHB)
Celulosa	Proteína de soya	Polihidroxicanoatos (PHAs)
Quitina/Quitosano	Zeína	Alcohol Polivinílico (PVA)
Pectina		
Almidón		
Goma Xantana		

Las películas plásticas a base de polisacáridos/carbohidratos, son polímeros hidrofílicos por lo que tienen una baja barrera a la humedad, los primeros estudios de este tipo de biopolímeros se refieren a la celulosa y el almidón. Generan interés ya que tienen mucha viabilidad y un bajo costo, por que usualmente se consiguen por medio de la biomasa, además de que tienen la capacidad de crear películas (filmes) o membranas con facilidad, gracias a que los segmentos del polímero se rompen y forman nuevas cadenas poliméricas en la matriz del filme por medio de la evaporación del solvente utilizado creando enlaces de hidrogeno con características hidrofílicas, sin embargo sus bajas propiedades mecánicas limitan sus aplicaciones <sup>[103]</sup>.

El Alcohol Polivinílico (PVA o PVOH) es uno de los biopolímeros sintéticos que se obtienen fácilmente a partir de monómeros biológicos renovables o de fuentes mixtas de biomaterial y petróleo. El PVA también posee buena biocompatibilidad, es biodegradable, no tóxico, inodoro, soluble en agua y tiene cristalinidad. Tiene propiedades mecánicas interesantes y una excelente capacidad de formación de películas debido a la abundancia de grupos hidroxilo y enlaces de hidrógeno intermoleculares <sup>[104]</sup>. Figura 25



**Figura 25** Molécula de PVA.

El PVA ha atraído gran atención como posible material de empaque, sin embargo, las películas a base de PVA tienen baja resistencia al agua y a los ambientes húmedos debido a su naturaleza hidrófila que provoca hinchazón, mala barrera al oxígeno y bajas propiedades mecánicas. Es por eso que se elige como opción en las mezclas de biopolímeros como por ejemplo junto al quitosano <sup>[104]</sup>. Sin embargo, su alto costo en comparación con otros polímeros sintéticos lo hace menos deseable para su uso en aplicaciones de empaque <sup>[105]</sup>.

### **3.15 Películas plásticas y recubrimientos alimenticios**

Para la aplicación de los biopolímeros en la industria de los alimentos existen dos tipos de materiales: los recubrimientos y las películas plásticas (filmes) <sup>[106]</sup>. Los recubrimientos son materiales que se utilizan para recubrir, envolver y revestir alimentos para extender su vida, hablando desde su cosecha hasta su vida en anaquel, algunos de estos recubrimientos como las ceras pueden ser ingeridos sin causar daño alguno por el cliente final, por lo que no se requiere retirarlos. Los recubrimientos alimenticios ayudan a las capas naturales de la comida (ya sea frutas o verduras) para prevenir la pérdida de humedad, y para protegerlos de agentes patógenos que causarían la contaminación del alimento. Generalmente los recubrimientos tienen que tener un espesor menor a 0.3 mm <sup>[107]</sup>.

Las películas plásticas son capas delgadas independientes compuestas por una matriz polimérica que le da la estructura integral al material. Están constituidas por la matriz polimérica y otros aditivos <sup>[103]</sup>. Existen tres tipos de películas plásticas, las cuales se describen a continuación:

#### **1. Películas Biodegradables:**

Son aquellas que su fuente de fabricación es de la biomasa y que tienen la capacidad de degradarse en el medio ambiente, tanto en la tierra como en el agua, sin generar ningún tipo de contaminación <sup>[108]</sup>.

## 2. Películas Activas:

Se definen como materiales a los cuales se les agregaron ingredientes activos dentro/sobre el material de empaque, para aumentar la estabilidad y seguridad de los productos. Contienen o se le han agregado ingredientes activos que aumentan el potencial de protección para el producto en cuestión. El principio básico del empaque activo recae en las propiedades que se van a adquirir con esas sustancias añadidas o implícitas en la matriz (en algunos biopolímeros) ejemplos de estos agentes son los fitocompuestos, los antimicrobianos, antioxidantes, antimicrobianos y probióticos. Dándole al material la habilidad de liberar constituyentes activos que impedirán la degradación del alimento, ya sea por contaminación biológica o por agentes físicos <sup>[108]</sup>.

## 3. Películas inteligentes:

Se define como un sistema coordinado en el material que permite al consumidor obtener información de la calidad del alimento monitoreando las condiciones de este, esto se puede realizar gracias a sensores y/o aditivos que permiten leer cambios en el producto. El ejemplo más utilizado es la medición de pH por cambio de color al añadir sustancias al polímero que contienen cianidinas <sup>[108]</sup>.

### **3.15.1 Propiedades y características de las películas activas y recubrimientos para empaque de alimentos**

Los biopolímeros presentes en las mezclas de soluciones para formar películas plásticas compuestas deben tener en general propiedades que permitan su óptima aplicación en empaque de alimentos. Ya que son clave para lograr el rendimiento y condiciones deseadas para el material y su interacción con los alimentos. En la figura 26 se enlista a manera de resumen cada una de las propiedades que son fundamentales en la aplicación del material.



**Figura 26** Características principales para materiales de aplicación de empaque alimenticio.

### 3.15.2 Elaboración de películas plásticas y recubrimientos.

Para el desarrollo de películas plásticas y recubrimientos se recurre a métodos de mezclado de biopolímeros ya sea naturaleza o sintéticos, convirtiéndolos en biopolímeros compuestos. La mezcla de biopolímeros se define como la combinación de al menos dos sustancias macromoleculares (biopolímeros, polímeros o copolímeros) a una concentración no mayor al 2% en peso. El desarrollo de compuestos de biopolímeros se relaciona con la capacidad de desarrollar nuevos materiales poliméricos con propiedades personalizadas diferentes a sus componentes originales <sup>[109]</sup>.

Aun cuando se tiene una mezcla de dos o más biopolímeros, el proceso de reticulación de las soluciones es intenso, gracias al gran número de cadenas reactivas, lo que hace que se formen películas rígidas y quebradizas <sup>[100]</sup>, por lo que las propiedades mecánicas no serán suficientes para su aplicación, por tal motivo se añaden aditivos para mejorarlas, hay distintos tipos de aditivos: los plastificantes, nanomateriales, antimicrobianos, antioxidantes, colorantes, saborizantes entre otros <sup>[103]</sup>.

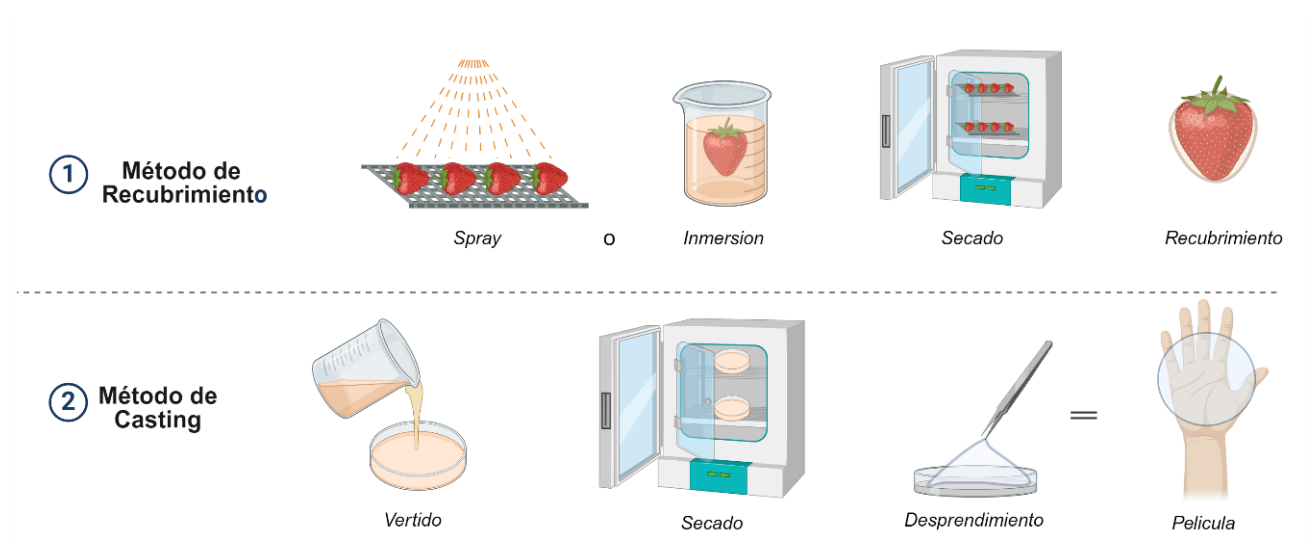
Los plastificantes son agentes de bajo peso molecular que se incorporan a la solución de biopolímeros para incrementar las propiedades mecánicas como la flexibilidad y la elongación. También, aumentan la procesabilidad el volumen de la estructura del polímero y la movilidad de la matriz del polímero, disminuyendo el radio de las regiones cristalinas en la región amorfa y la temperatura de transición vítrea <sup>[103]</sup>. Sin embargo, también disminuyen la capacidad de barrera, incrementando la permeabilidad al agua y gases y a los olores, así como la reducción de propiedades mecánicas como el esfuerzo de tracción. Los plastificantes más comúnmente utilizados son el glicerol, polietilenglicol (PEG), sorbitol, propilenglicol (PG), etilenglicol (EG), algunos monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, lípidos y sus derivados <sup>[100]</sup>.

Entre los aditivos antimicrobianos y antioxidantes que se agregan a la solución de biopolímeros se encuentran los aceites esenciales, extractos de plantas y los nanomateriales (nanopartículas metálicas/no metálicas en solución coloidal) <sup>[103]</sup>.

Para formar la película plástica es necesario que uno de los biopolímeros sea capaz de formar una estructura central con suficiente cohesión. El grado de cohesión de la matriz del polímero nos dirá sus propiedades tales como densidad, porosidad, permeabilidad, flexibilidad y fragilidad <sup>[103]</sup>. Para la preparación y elaboración de películas plásticas se prefiere por aquellos polímeros con bajo peso molecular y que tengan facilidad de reorganización de las cadenas poliméricas en la matriz de la película. Esto se logra disolviendo el polímero en una solución, posteriormente se deja evaporar, esto hará que nuevos enlaces de hidrogeno se formen y se obtenga atracción iónica electroestática <sup>[100]</sup>.

De lo antes mencionado se derivan dos métodos que son comúnmente utilizados para la elaboración de recubrimientos y películas bioplásticas a escala de laboratorio: el método de inmersión y el método de casting <sup>[98]</sup>. Sin embargo, existen otros métodos de fabricación de películas plásticas, como el método de extrusión, inyección, termoformado, inyección soplado, electroasreado y electrohilado, pero son utilizados comúnmente a escala industrial y para mezclas en los cuales el mayor porcentaje del compuesto es un polímero sintético. Por lo tanto para fines de investigación y desarrollo

de empaques a base de biopolímeros se opta por los primeros dos métodos mencionados (Figura 27) [110].



**Figura 27** Métodos de laboratorio para aplicación de biopolímeros en alimentos.

*El método de recubrimiento* consiste en formar una película delgada en el alimento por medio de una solución, dispersión o emulsión. La solución del biopolímero es aplicada directamente en forma líquida en la superficie del producto (ya sea en forma de inmersión o spray), posterior a eso, se deja secar para que el líquido evapore y solo que una capa delgada en el producto, haciendo que se vuelva parte del mismo hasta su consumo [98].

En cambio, el *método de casting* forma películas plásticas independientes al producto, por medio de una solución de biopolímeros, esta se vierte sobre un molde plano o placa a un espesor establecido según se requiera, y se deja secar a temperatura ambiente o en un horno para su evaporación, quedando así solo la película plástica. Es importante para lograr una buena película con una red tridimensional, va a depender de la elección de los polímeros y el plastificante así como las condiciones externas como el pH, la temperatura de secado, el tiempo de secado y el contenido de humedad [103]. Estos dos métodos tienen mucha similitud tanto en la formulación como en el secado, y se recomienda que se tengan ambientes controlados para una óptima calidad [98].

### 3.16 Caracterización de películas plásticas a base de biopolímeros

Las películas plásticas a base de biopolímeros deben cumplir con una serie de características que aseguran una buena función en su aplicación, en la tabla se muestran las técnicas de caracterización más utilizadas. En la tabla 7 se describen estas técnicas.

**Tabla 6** Técnicas de caracterización para análisis de películas plásticas.

Tipo de caracterización	Técnica de caracterización
<b>Fisicoquímica</b>	Espesor Densidad aparente Contenido de humedad Grado de absorción o hinchabilidad Solubilidad Transparencia/opacidad Morfología: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEM</li> <li>• AFM</li> </ul>
<b>Química</b>	FTIR
<b>Térmica</b>	TGA DSC
<b>Mecánica</b>	Esfuerzo de tracción Elongación Módulo de Young
<b>Biológica</b>	Difusión en Agar Biodegradabilidad en el suelo
<b>Habilidad potencial en empaque alimenticio en frutas</b>	Pérdida de peso Acidez total Sólidos totales solubles

### 3.16.1 Espesor de las películas plásticas

La estimación del espesor de las películas plásticas es una propiedad que está involucrada con el contenido de humedad, hinchabilidad, solubilidad y las propiedades mecánicas como el esfuerzo de tracción, elongación y módulo de Young <sup>[111]</sup>. También nos indica si el material será óptimo para aplicaciones de empaque, ya que las películas plásticas comerciales tienen un espesor típico de 0.0127 – 1.016 mm.

Este se lleva a cabo utilizando herramientas de medición como micrómetro o vernier, se miden diferentes áreas del material (mínimo 4) y se saca un promedio de todas las mediciones, para obtener el espesor final del material <sup>[112]</sup>. Es importante destacar que al controlar y determinar el espesor de las películas plásticas va involucrado con la visualización de la estructura del material, como la homogeneidad de espesor el cual va a determinar su transparencia y propiedades mecánicas <sup>[111]</sup>.

### 3.16.2 Densidad aparente

La densidad ( $\rho$ ), es una propiedad física de la materia la cual se describe como la masa ( $m$ ) por unidad de volumen ( $V$ ) <sup>[113]</sup>. La unidad que se utiliza en el sistema métrico es  $\text{kg/cm}^3$  o  $\text{g/cm}^3$ . Lo cual indica la compactibilidad de las partículas y átomos en el material <sup>[114]</sup>.

La densidad relativa ( $\rho$  relativa) es la relación entre las masas de un volumen determinado de material y de un volumen equivalente de agua a temperatura ambiente (23 °C) tomando en cuenta que la densidad del agua es de  $1 \text{ g/cm}^3$ . El resultado es adimensional.

La densidad aparente ( $\rho$  aparente) es el cociente entre la masa de un determinado material sólido por unidad de volumen. Es decir, cuanto ocupará dicho material considerando el volumen real debido a su morfología. Para calcular la densidad aparente en las películas plásticas se utiliza la siguiente ecuación 15:

$$\rho \text{ aparente} = \frac{W}{\left(\pi \times \left(\frac{D^2}{4}\right) \times H\right)} \quad (15)$$

Donde:

$W$ = Peso de la muestra (g)

$D$ = Diámetro de la muestra (cm)

$H$ = Altura de la muestra (cm)

Los cambios en este parámetro están relacionados a la porosidad y capacidad de filtración de aire y agua del material. Entre más baja sea la densidad aparente los valores de las propiedades mencionadas anteriormente son más altos <sup>[115]</sup>.

### **3.16.3 Contenido de humedad (MC), absorción de agua o grado de hinchabilidad (SP) y solubilidad (S).**

El contenido de humedad de los materiales se define como la cantidad de agua que contiene el material. Las películas plásticas deben mantener niveles de humedad bajos. Conocer el porcentaje de humedad de los materiales es de suma importancia para el empaque alimenticio, ya que la cantidad de agua presente en las películas es indicador de la capacidad hidrofóbica o hidrofílica del material, si el contenido de humedad es bajo su capacidad hidrofóbica es mayor, en cambio sí es alto el material es muy hidrofílico <sup>[116]</sup>.

La absorción de agua o hinchabilidad de los polímeros se define como el fenómeno de transferencia de fluido de masa en el material. Absorción de agua o grado de hinchabilidad es la capacidad de los materiales poliméricos de absorber alguna solución expresada en masa o volumen. La capacidad de absorción es dependiente a la naturaleza de los polímeros, el solvente, la interacción del polímero y su estructura, y de los aditivos también es una propiedad que tiene influencia directa con su aplicación. La mayoría de los biopolímeros son más susceptibles a la influencia del agua y su propiedad hidrofílica <sup>[117]</sup>. Para los biopolímeros el grado de hinchabilidad es una propiedad crucial a conocer para entender el comportamiento del material durante su aplicación. En el empaque alimenticio se requieren un bajo grado de hinchabilidad, lo cual da mejores propiedades de barrera para los alimentos <sup>[117]</sup>.

La solubilidad en agua se define como el contenido de materia seca que queda en una solución después de contener por determinado tiempo un material. El porcentaje de solubilidad es la medida de degradabilidad que tendrá el material in vitro en un fluido en específico (usualmente agua). Este estudio se concentra en el comportamiento indeseado o la pérdida de propiedades durante su aplicación [116].

Para la obtención de estos valores, la metodología a seguir según Baron et al [118], donde se cortan 3 muestras del material en dimensiones iguales, obtener su peso inicial ( $W_0$ ), después se meten al horno por 24 h a 100 °C, se sacan y se vuelve a obtener su peso ( $W_1$ ), las muestras obtenidas se ponen en inmersión en agua destilada a temperatura ambiente (25 °C) en agitación constante por 24 horas, se sacan las muestras y se filtran, se obtiene su peso ( $W_2$ ), y se secan de nuevo al horno por 24 h a 100 °C ( $W_3$ ). Ya obtenidos los datos, se procede a calcular cada uno de los valores con las siguientes ecuaciones (15, 16 y 17):

$$MC = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad 15)$$

$$SP = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad 16)$$

$$S = \frac{W_1 - W_3}{W_1} \times 100 \quad 17)$$

Donde:

$W_0$ = Peso inicial

$W_1$ = Peso seco

$W_2$ = Peso después de inmersión

$W_3$ = Peso final

#### 3.16.4 Transparencia/Opacidad

La transparencia es una propiedad óptica importante en el desarrollo de películas plásticas a base de biopolímeros, ya que afecta la apariencia del producto empacado, por lo que está muy vinculado a la aceptación del consumidor. Las películas plásticas a base de polisacáridos tienen la particularidad de ser transparentes, las mezclas de

proteínas con polisacáridos tienden a ser homogéneas y también cuentan con dicha propiedad [108].

La opacidad es la propiedad que no permite que la luz atraviese un material. Cuanto menor sea la opacidad, mayor la cantidad de luz que puede atravesar el material [119]. La opacidad se determina midiendo la absorbancia de la película plástica a 600 nm utilizando espectroscopia UV, y se calcula con la siguiente ecuación 18 [119]:

$$Opacidad = \frac{Abs_{600}}{d} \quad 18)$$

Donde:

$Abs_{600}$  = Valor de absorbancia a 600 nm

$d$  = Espesor de la película (mm)

### 3.16.5 Análisis Térmico

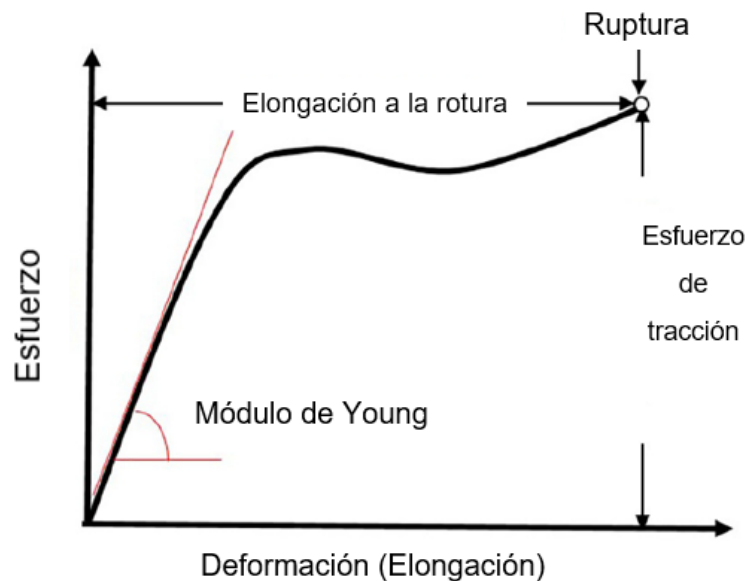
Análisis Termogravimétrico (TGA): en películas plásticas a base de biopolímeros, el TGA se utiliza para determinar la estabilidad térmica, la estabilidad oxidativa, la composición química y el contenido de agua. También, es una herramienta útil para verificar la incorporación de NPs y compuestos activos en películas/membranas de biopolímeros analizando el aumento o disminución de los picos de degradación térmica o evaluando la degradación térmica más rápida o lenta [117].

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): DSC es una técnica útil para el análisis de biopolímeros para la determinación de eventos térmicos, estabilidad oxidativa, degradación térmica y pérdida de agua. También, permite la determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), que es una temperatura que indica la transición reversible en materiales amorfos desde un estado frágil a un estado viscoso.  $T_g$  es una técnica térmica que puede indicar la miscibilidad de mezclas de biopolímeros [117].

### 3.16.6 Pruebas mecánicas

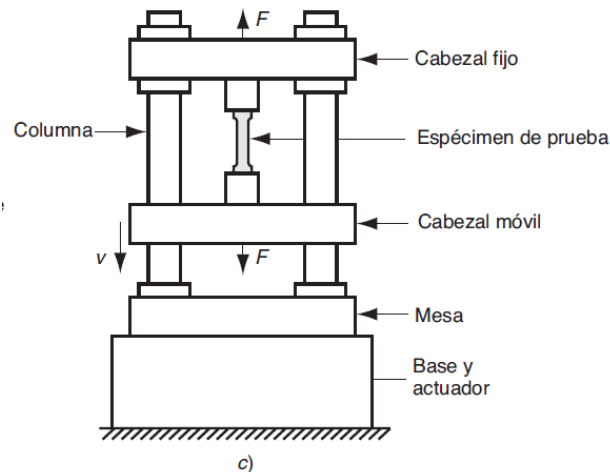
El estudio de las propiedades mecánicas tiene un alto factor de importancia en el área de los biopolímeros, principalmente porque estas propiedades definen las limitaciones y el comportamiento de estos materiales, ya que no se comportan igual que los polímeros sintéticos. En cuanto a las películas plásticas a base de biopolímeros y a las membranas, las propiedades mecánicas se evalúan principalmente por ensayos de tracción [117]. El esfuerzo se define como la resistencia interna de un material cuando se le aplican fuerzas externas. Es el resultado de las fuerzas externas aplicadas entre el área de una sección transversal [120]. La deformación es el cambio de forma y de área de sección transversal, producto de una fuerza. Es una referencia, por lo que es adimensional [120].

El esfuerzo de tracción es causado por fuerzas regulares aplicadas a la muestra. La capacidad de tracción del biopolímero se caracteriza en una curva de esfuerzo deformación (Figura 28), que nos da como resultado las propiedades de Esfuerzo de tracción (TS), elongación a la rotura (EAB) y el módulo de Young (Y) [117].



**Figura 28:** Curva esfuerzo-deformación típica para películas bioplásticas.

El procedimiento usualmente utilizado para el estudio de estas propiedades es la prueba de tensión con la maquina universal (ver figura 29), en la cual, durante la prueba, se aplica una fuerza que jala el material y tiene a estirarlo y reducir su espesor.



**Figura 29:** Prueba de tensión

Para la determinación de las propiedades mecánicas se siguen métodos estandarizados para un mejor comparativo, en este caso se sigue el ASTM (American Society for Testing Materials), específicamente la ASTM D882 “Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting”, con el cual nos dice la metodología a seguir para analizar las propiedades mecánicas de películas plásticas de hasta 0.25 mm de espesor. Este tipo de ensayos son una herramienta esencial para la evaluación de películas plásticas para aplicaciones de empaque alimenticio [117].

### 3.16.7 Actividad Antimicrobiana

En cuanto a la actividad antimicrobiana, es posible determinar la actividad microbiana bioestática o biocida de las propiedades de las películas en medio sólido o líquido. La elección del método dependerá de las características de la película, así como el microorganismo que se utilizará [117]. El método utilizado con mayor frecuencia es el de difusión en agar, ya que evalúa cualitativamente la actividad antimicrobiana de las películas plásticas [117].

### 3.16.8 Biodegradabilidad de las películas en el suelo

La biodegradabilidad de las películas plásticas se utiliza para determinar su tiempo de vida posterior a su uso en el medio ambiente. Las condiciones ambientales como la temperatura, la humedad, el pH y los nutrientes y agentes a los que está expuesto por cubrir el alimento como microorganismos afecta su biodegradación [104].

El procedimiento a seguir según Ediyilyam et al.[7] el cual consiste en enterrar a una profundidad de 10 cm el material a analizar en contenedores con tierra que contengan 40-45% de materia inorgánica, 5% de materia orgánica y 25% de agua y aire). Se deja durante 2 semanas y se mantiene la tierra húmeda añadiendo un poco de agua todos los días. El exceso de agua se retira todos los días por medio de un agujero en la parte baja del recipiente. Una vez finalizado el tiempo las muestras se sacan del recipiente y la pérdida de peso es calculada con la siguiente ecuación 19:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{W_f - W_d}{W_f} \times 100 \quad 19)$$

Donde:

$W_f$  = Peso final de las películas plásticas (g)

$W_i$  = Peso inicial de las películas plásticas (g)

### 3.16.9 Habilidad potencial de las películas plásticas a base de biopolímeros en aplicaciones en frutas

Las frutas y verduras son parte fundamental de la alimentación, ya que funcionan como fuente de energía, vitaminas, minerales, fibras y fitoquímicos con altos valores antioxidantes. Considerando que son derivados de seres vivos, los cambios físicos, químicos y biológicos son inevitables desde su cosecha causando daños en la calidad de vida y duración hasta su uso final. El oxígeno es necesario para todos los seres vivos, sin embargo, es el principal causante de la oxidación, sobre todo después de que las frutas y verduras son cosechadas, esta oxidación es causante de acelerar el desarrollo

de azúcares y la pérdida de agua <sup>[100]</sup>. El deterioro de frutas y verduras se lleva principalmente bajo los siguientes mecanismos:

Respiración: La respiración es el proceso durante el cual los componentes orgánicos se descomponen con la liberación de CO<sub>2</sub>, agua y calor. Este proceso indeseable provoca una disminución en el contenido de carbohidratos y pérdida de peso lo que lleva a una disminución del valor del producto y pérdida de sabor. La respiración está influenciada por la temperatura, la humedad y el gas circundante <sup>[100]</sup>.

La pérdida de agua: es el proceso de movimiento del agua a través de un tejido y su evaporación. Es la principal causa de deterioro, ya que resulta en pérdida de peso, así como pérdidas en apariencia (arrugas, marchitez, color, textura) y valor nutricional. El agua se pierde durante la transpiración debido a la diferencia en la presión del vapor de agua entre la superficie del producto y el ambiente circundante. La transpiración está influenciada por factores internos como las características morfológicas y estado de maduración) y externos como temperatura y humedad relativa <sup>[100]</sup>.

El deterioro microbiano las frutas y verduras son muy sensibles, sobre todo cuando se quita su protección natural y se daña el tejido durante el procesamiento, de modo que los azúcares y las proteínas libres presentan un medio adecuado para el crecimiento microbiano, que se ve favorecido aún más por el alto contenido de agua <sup>[100]</sup>.

Un cambio de pH (acidificación), contribuyen a la calidad final de las frutas y verduras, como cambios en la firmeza y aroma <sup>[100]</sup>.

La metodología a seguir según para el análisis de la habilidad de las películas plásticas a base de biopolímeros se lleva a cabo recubriendo la fruta o verdura con el material a analizar, y se pone en comparación un blanco (fruta o verdura a recubrir) y con un material de empaque comercial (película de polietileno), se dejan por un tiempo entre 5 a 15 días a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, se monitorea diariamente pesando cada una de las muestras, también se hace análisis visual del cambio de color o aspecto de la fruta y del olor. Al finalizar el tiempo de exposición, las muestras se pesan por última vez y se procede a realizar el análisis de pérdida de peso, acidez total de la fruta y los sólidos totales solubles.

### 3.16.10 Pérdida de peso de las uvas

La pérdida de peso está relacionada con la pérdida de agua en la fruta, la cual es un factor importante en la evaluación de la calidad. Sin embargo, la pérdida de agua tiene un impacto grande en la apariencia de la fruta, ya que los consumidores se basan en eso para su compra. La ecuación 20 para el cálculo de % de pérdida de agua en la fruta es:

$$WLR\% = \frac{W_0 - W_1}{W_0} (100) \quad 20)$$

Donde:

$W_0$  = Peso inicial (g)

$W_1$  = Peso final (g)

### 3.16.11 Acidez total

La acidez total en la fruta, es un parámetro que determina la madurez de la muestra. Esta es un factor muy importante ya que nos dice que tan bien se almacenara la fruta y su sabor. Con la ecuación 21, se obtiene este valor.

$$\%Acidez = \frac{(0.064)(N \text{ de NaOH})(mL \text{ NaOH})}{g \text{ muestra}} (100) \quad 21)$$

### 3.16.12 Sólidos totales solubles

Los sólidos totales solubles es un parámetro importante que afecta la calidad de la fruta y la aceptabilidad de los consumidores.

Para conocer el contenido de sólidos solubles (generalmente azúcares) disueltos en un líquido, se determina con el índice de refracción, y este se expresa en grados Brix. Los grados Brix es la unidad de medida de la cantidad de sólidos solubles que hay en una sustancia por el peso total de la solución. (100 g de solución).

El índice de refracción en jugos de frutas será mayor cuanto mayor sea la cantidad de azúcar presente en la muestra. Ver ecuación 22:

$$Indice \ de \ Madurez = \frac{^{\circ}Brix}{Acides \ Total \ titulable} \quad 22)$$

# CAPITULO 4: METODOLOGÍA

## 4. Metodología de trabajo

Para el desarrollo de las películas plásticas a base de biopolímeros se diseñó una metodología dividida en 3 fases, las cuales se describen a detalle en la figura 30.

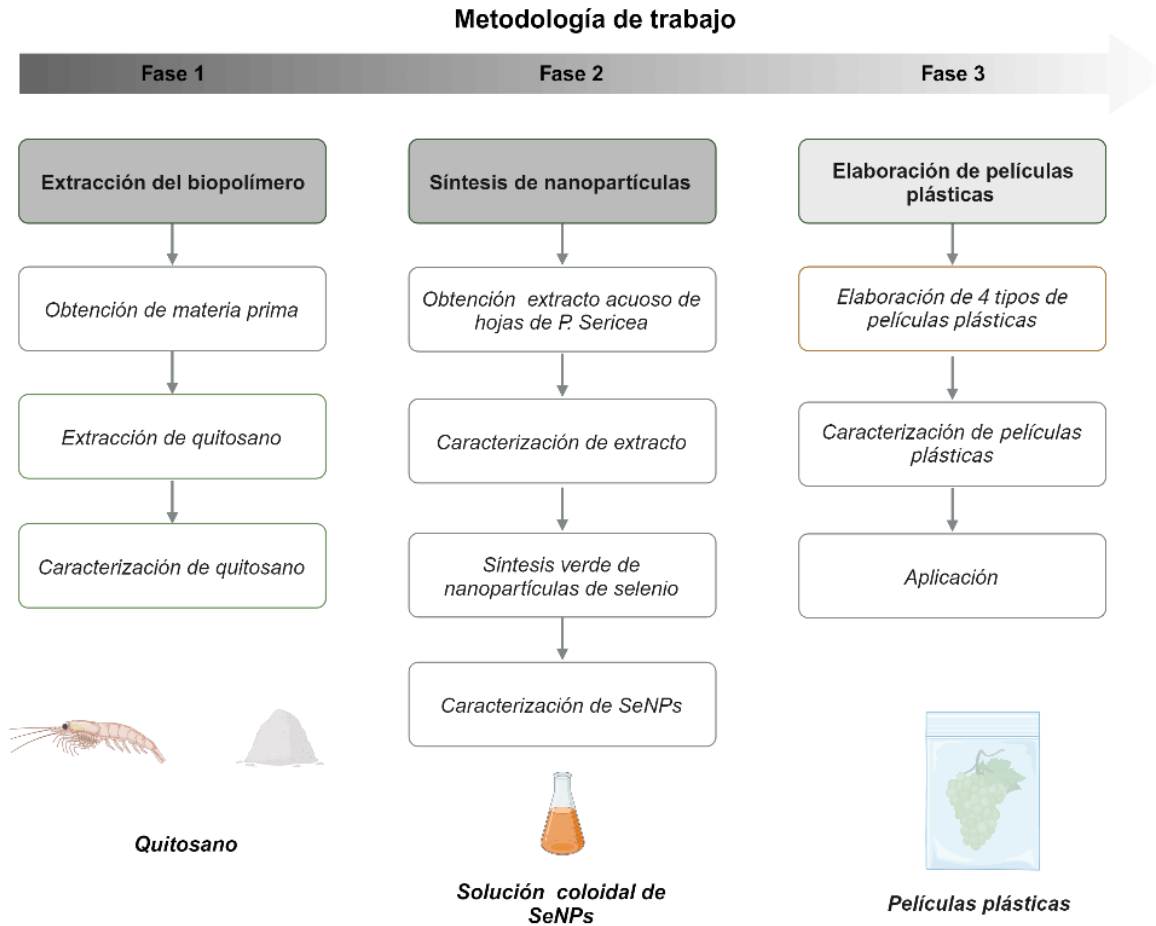


Figura 30: Metodología de trabajo.

## **4.1 FASE 1: Extracción de quitina y quitosano**

Se extrajeron quitina y quitosano de exoesqueletos de camarón de la especie *Farfatepenaeus californiensis*.

### **4.1.2 Obtención de materia prima**

Se recolectaron desechos de exoesqueletos de camarón en un restaurante de mariscos ubicado en la ciudad de Mexicali, Baja California, México. Posteriormente, los exoesqueletos fueron lavados con abundante agua y jabón líquido (1wt. %). Una vez lavadas las cascaras, estas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio (1% wt/v) por 1 h, posterior a la desinfección, se procedió a enjuagar con agua potable, eliminando cualquier residuo.

Para su óptimo manejo, los exoesqueletos de camarón fueron deshidratados naturalmente, exponiéndolos a la luz del sol sobre una plancha de metal durante 8h a una temperatura local de 46-48 °C. Una vez secas, las cáscaras se trituraron con una licuadora convencional hasta obtener un polvo grueso de aproximadamente (10 µm).

### **4.1.3 Extracción de quitina y quitosano**

Para la extracción de quitina y Q, se utilizó el método químico, y se realizaron 4 extracciones diferentes, donde difiere solamente el tiempo que se utilizó para desacetilar la quitina obtenida (1 h, 2 h, 3 h y 4 h) esto con el fin de obtener quitosano con el peso molecular adecuado para aplicaciones de empaque alimenticio.

Para el proceso de desmineralización, el polvo de exoesqueletos de camarón fue sumergido en una solución de 1N HCl (1:10, v/v%) a 60 °C por 35 min bajo agitación constante. Las cáscaras desmineralizadas se lavaron 3 veces con abundante agua hasta alcanzar un pH neutro.

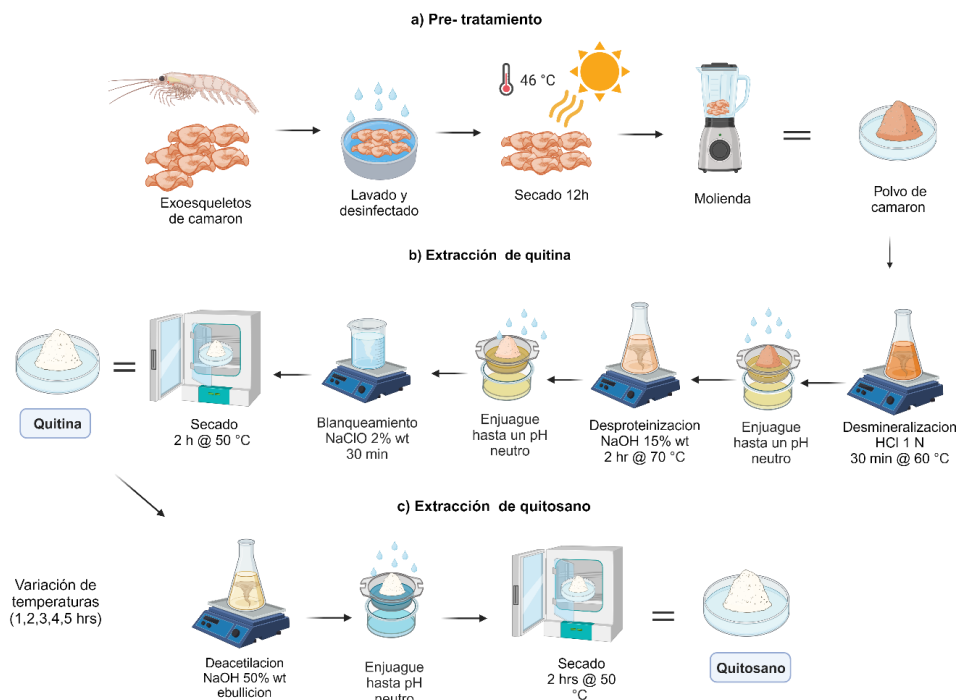
Para la desproteínización y obtención de quitina, una solución de NaOH (15wt%) con una proporción de 1:10 fue añadida al producto desmineralizado a una temperatura de 65 °C

$\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h en agitación constante. Para el blanqueamiento, la quitina fue tratada con una solución de NaOCl (1%wt/v) durante 30 min, para posteriormente secarla en un horno de aire seco (Thermo Scientific) a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h.

Por último, la quitina obtenida fue separada en 4 muestras y fueron sometidas al proceso de desacetilación por medio de una solución de NaOH (50%wt/v) en proporción de 1:10 y calentada a punto de ebullición a diferentes tiempos como se muestra en la tabla 8, bajo agitación constante. El producto obtenido es Q, y este se enjuagó con abundante agua hasta su neutralización, para finalmente secarlo en el horno de aire seco a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h. Figura 31 (pasos de extracción).

**Tabla 7:** Diferentes temperaturas en el método de desacetilación.

Muestra	Tiempo de desacetilación
1	1 hora
2	2 horas
3	3 horas
4	4 horas
5	5 horas



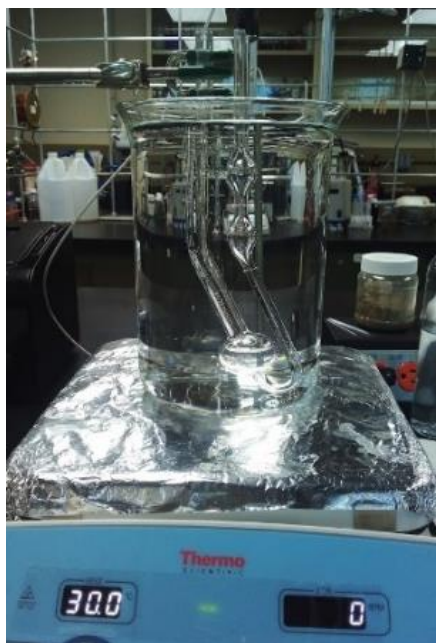
**Figura 31:** Pasos de extracción de quitina y quitosano por método químico.

## 4.2 Caracterización de Quitosano

El quitosano extraído fue caracterizado para conocer sus propiedades físicas y químicas y así elegir aquel que tuviera las mejores para aplicación de empaque alimenticio, cada uno de los resultados fue comparado con quitosano comercial. A continuación, se describen cada una de las técnicas de caracterización aplicadas al quitosano extraído y comercial.

### 4.2.1 Determinación del Peso Molecular

Para el cálculo de peso molecular promedio de cada una de las muestras se utilizó el método de viscosimetría capilar utilizando un viscosímetro tipo Cannon-Fenske, manteniéndolo dentro de un vaso de precipitados de 3 L lleno de agua a 30 °C con tolerancia de  $\pm 1$  °C. [121,122] Se utilizaron 6 muestras de Q y se prepararon por disolución en una mezcla de ácido acético (0.25 M) y acetato de sodio (0.25 M). De este solvente se procedió a preparar una solución patrón de Q con una concentración de 0.002 g/mL. Posteriormente, se prepararon disoluciones en las siguientes concentraciones: 0.000182 g/mL, 0.00033 g/mL, 0.000462 g/mL, 0.000571 g/mL, 0.000667 g/mL y 0.000750 g/mL. Establecidas las condiciones de trabajo (Figura 32) y obtenidos los datos se graficó cada uno de los puntos de la viscosidad reducida respecto a la concentración de la solución, y a partir de las ecuaciones planteadas según la literatura y se tomó una regresión lineal para la determinación de la viscosidad intrínseca y con este resultado obtener finalmente el peso molecular, esto utilizando las constantes empíricas correspondientes a la naturaleza del Q, del solvente y de la temperatura, en este caso  $k$  es igual 0,014 g/ml y  $a$  es igual a 0.83 [123].



**Figura 32:** Montaje de viscosímetro Cannon-Fenske a temperatura controlada.

#### **4.2.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Para determinar la correcta extracción de quitina y Q, las muestras tratadas fueron analizadas mediante FTIR-ATR. Utilizando un equipo marca Perkin Elmer Spectrum One. El análisis se llevó a cabo en un rango de  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  a una velocidad de barrido de  $0.5\text{ cm}^{-1}/\text{s}$  a temperatura ambiente. Los espectros resultantes fueron comparados con muestras de Q comercial (Sigma Aldrich).

#### **4.2.3 Grado de desacetilación**

Para determinar el contenido de grupos amino de todas las muestras extraídas a diferentes tiempos de desacetilación del quitosano, se utilizó un potenciómetro HATCH. Se diluyeron 0.5 g de quitosano en 20 mL HCl (0.3 M), enseguida se tituló la solución de NaOH (0.1 M) midiendo el cambio de pH por cada 2 mL de titulante, mientras se tenía agitación continua. Finalmente se construyó una curva de titulación de pH vs mL de NaOH añadido para calcular el grado de *N*-desacetilación del quitosano.

#### **4.2.4 Grado de *N*-acetilación**

Para obtener el grado de *N*-acetilación del quitosano, se tomaron los resultados de FTIR y se tomaron las bandas características de la amida III ( $1320\text{ cm}^{-1}$ ) y los grupos metilo ( $1420\text{ cm}^{-1}$ ) para el cálculo mediante la ecuación anteriormente mencionada.

#### **4.2.5 Determinación del contenido de cenizas**

Para obtener el contenido de cenizas, el Q extraído fue tratado por medio de pirólisis. En una mufla (Vulcan), se colocó 1g de quitosano en un crisol refractario. La muestra se calentó a  $600\text{ °C}$  con una rampa de calentamiento de  $5\text{ °C}/\text{min}$  por 5 h y el producto resultante fue pesado en una balanza analítica. Los datos obtenidos fueron utilizados para el cálculo final de contenido de cenizas.

#### **4.2.6 Rendimiento Total**

Para el cálculo del rendimiento de extracción tanto de quitina como de Q, se pesaron las cascarras de exoesqueletos de camarón en un inicio, y posterior a el tratamiento químico para la extracción, ya obtenido el quitosano seco, se obtuvo el peso final de este y se calculó el rendimiento total, aplicando la ecuación correspondiente.

#### **4.2.7 Análisis Térmico (DSC)**

La DSC de barrido se llevó a cabo con el equipo TA Instruments DSC Q2000 en el cual una muestra de 1mg de quitosano fue colocado en un crisol de acero inoxidable y fue sellado herméticamente a presión. Las muestras fueron calentadas de los  $30\text{ °C}$  hasta los  $900\text{ °C}$  en rampas de  $20\text{ °C}$  por minuto, en presencia de una atmósfera inerte de nitrógeno.

#### **4.2.8 Análisis Termogravimétrico (TGA)**

Para el análisis TGA de las muestras de quitosano, se utilizó el equipo TA Instruments Q500. Donde se colocó 1mg de quitosano en un contenedor de platino bajo un flujo constante en una atmósfera de nitrógeno, con una velocidad de calentamiento de 20°C/min en un rango de temperatura de 25-900 °C.

#### **4.2.9 Análisis Morfológico y elemental**

Para analizar la morfología de la superficie de la muestra en polvo de quitina y quitosano se utilizó la técnica de SEM con un equipo marca (Quanta 250) utilizando un voltaje de 10 kV con un aumento de 5000 x. El polvo de quitosano fue recubierto con una fina capa de Au utilizando recubrimiento por pulverización catódica. Mientras que para la muestra de quitina se utilizó el equipo: Lyra 3 Tescan, utilizando un voltaje de 15 kV con un aumento de 5000x, sin ningún tipo de recubrimiento. Posterior al escaneo, las composiciones elementales de las muestras fueron sometidas al análisis EDX utilizando los detectores acoplados en los respectivos microscopios antes mencionados.

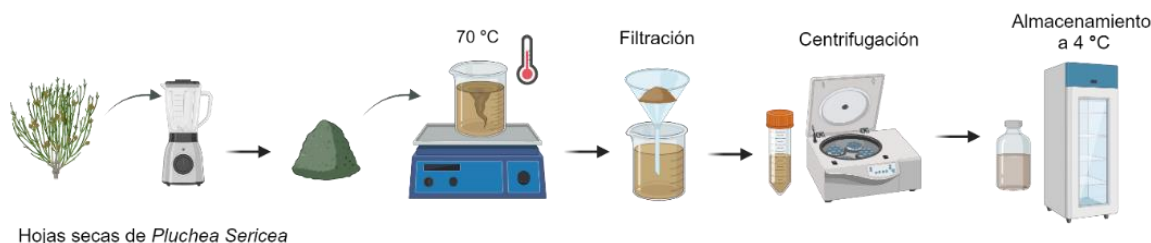
### 4.3 FASE 2: Síntesis de SeNPs

Para la obtención de SeNPs, se optó por utilizar el método conocido como bottom-up por medio de síntesis verde, utilizando el extracto acuoso de *P. Sericea*. Por lo que esta sección se divide en la preparación y caracterización de extracto acuoso y la síntesis y caracterización de SeNPs.

#### 4.3.1 Preparación de extracto acuoso de *Pluchea Sericea* (Cachanilla)

La planta *P. Sericea* se recolecto en el Valle de Mexicali, ubicado en el estado de Baja California, los reactivos selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , Sigma Aldrich) y ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , Sigma Aldrich) en polvo. Posterior a la recolección, las hojas frescas de *P. Sericea* se lavaron con agua y detergente líquido y se desinfectaron con una solución al 1% de hipoclorito de sodio, luego se enjuagaron con abundante agua y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. Las hojas secas se trituraron en una licuadora convencional hasta obtener un polvo fino.

Para la preparación del extracto acuoso en 100 mL de agua destilada se añadieron 10 g de polvo de hojas de la planta, y se calentó por 1 hora a 70 °C en agitación constante de 300 rpm. Después se filtró con un filtro Whatman #1 y se centrifugó para eliminar cualquier residuo sólido. Finalmente, el extracto se almacenó a temperatura de 4 °C para su conservación. Figura 33.



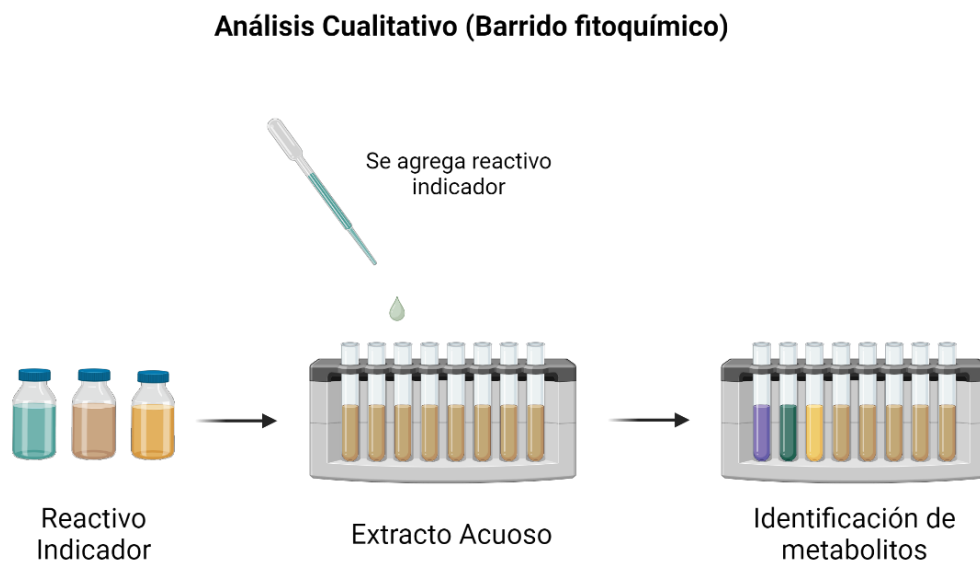
**Figura 33** Proceso de elaboración de extracto acuoso de hojas de *P. Sericea*.

### 4.3.2 Caracterización del extracto acuoso

Se realizó un análisis cualitativo al extracto acuoso de *P. Sericea*, utilizando el análisis de barrido fitoquímico, siguiendo la metodología de Balamurugan <sup>[85]</sup>, las pruebas realizadas se muestran a continuación:

### 4.3.3 Análisis Cualitativo (Barrido fitoquímico)

Las pruebas cualitativas consisten en primero colocar muestras pequeñas (2 mL) del extracto de la planta en tubos de ensayo, para identificar cada uno de los metabolitos secundarios con lo que esta cuenta, esto se puede conocer añadiendo cantidades establecidas de distintos tipos de reactivos indicadores a cada una de las muestras dependiendo que es lo que se quiere identificar, el resultado se obtiene cuando la muestra refleja algún color específico o alguna reacción en particular (figura 34). A continuación, se describen cada una de las pruebas cualitativas aplicadas al extracto analizado.



**Figura 34:** Identificación de metabolitos secundarios en el extracto *P. Sericea*.

#### **4.3.3.1 Test de Almidón (Lugol)**

Se tomaron 2 mL de extracto acuoso y se añadieron 3 gotas de solución de Lugol (Yodo) en un tubo de ensayo, el resultado es positivo si se obtiene un color azul.

#### **4.3.3.2 Test de Alcaloides (Wagner)**

Se tomaron 2 mL de extracto acuoso y se añadieron a un tubo de ensayo, posteriormente se le agrego 2 gotas de solución Wagner (Yodo-Potasio), si se forma un precipitado rojizo-café, el resultado es positivo a presencia de alcaloides.

#### **4.3.3.3 Test de glucósidos (Borntranger)**

En un tubo de ensayo con 2 mL de extracto de la planta, se agregaron 3 mL de cloroformo y se agito vigorosamente con un vortex, una vez formada la separación de capa de cloroformo, se añadió 1 mL de hidróxido de amonio a la solución total. La presencia de glicósidos es positiva si la solución toma un color rosado.

#### **4.3.3.4 Test de Fenoles (Bayer)**

Se añadieron 2 gotas de solución de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) diluido a 2 mL de extracto acuoso de la planta. Si se forma una coloración roja, azul, verde o morada, la presencia de fenoles es positiva.

#### **4.3.3.5 Test de taninos**

A 5 mL de extracto acuoso se le añaden 3 gotas de solución al 5% de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), la presencia de taninos se indica cuando se obtiene un color verde oscuro en la solución.

#### **4.3.3.6 Test de Flavonoides**

En un tubo de ensayo con un contenido de 2 mL de extracto acuoso de la planta, se le añadieron unas gotas de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ), la formación de un color naranja en la solución indica un resultado positivo para la presencia de flavonoides.

#### **4.3.3.7 Test de esteroides (Salkowski)**

A 2 mL de extracto de la planta se le añaden 2 mL de cloroformo y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, si aparece un color rojo, amarillo o verde, el extracto es positivo a esteroides.

#### **4.3.3.8 Test de Terpenoides**

Se toman 3 mL de extracto acuoso y se le añade 1 mL de cloroformo y 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente en las paredes del tubo de ensayo. La formación de un color café rojizo en la interface de las soluciones indica la presencia de terpenoides en la solución.

#### **4.3.3.9 Test de antocianinas**

A 2 mL de extracto acuoso de la planta, se le añadieron unas gotas de HCl 2N y 2 gotas de hidróxido de amonio, la conversión de la solución a un color rojo-rosa y azul-violeta indica la presencia de antocianinas.

#### **4.3.3.10 Test de Cumarinas**

Se tomaron 2 mL de extracto, y se le agregaron 3 mL de solución al 10% wt de hidróxido de sodio (NaOH), si la solución cambia a color amarillo, esta indica la presencia de cumarinas.

#### 4.3.3.11 Test de saponinas

Se tomaron 5 mL de extracto acuoso de *P. Sericea*, se añadieron a un tubo de ensayo y se procedió a agitarlo vigorosamente en un vortex marca, durante 1 minuto, si se obtiene una espuma blanca y esta dura más de 30 segundos y es estable, el resultado da positivo a presencia de saponinas.

#### 4.4 Síntesis verde de SeNPs

Se realizaron distintas pruebas para la correcta obtención de SeNPs, variando las cantidades tanto del precursor como del reductor y el extracto acuoso, también se varió la concentración de cada solución, así como el tiempo de síntesis y la temperatura aplicada. Al tener las diferentes soluciones coloidales de SeNPs, se caracterizó tanto en UV-Vis para corroborar la presencia de  $\text{Se}^0$ , como el tamaño, distribución y estabilidad coloidal de la solución (Potencial Z) teniendo los resultados óptimos según la literatura, se eligió la mejor muestra de SeNPs y se caracterizó por triplicado en posteriores análisis. En la tabla 9 se muestran las diferentes pruebas de síntesis en función de las variables antes mencionadas.

**Tabla 8:** Diversos métodos de síntesis de SeNPs en función de variables de temperatura, tiempo, molaridad y cantidad en mL de reductor y extracto.

# MUESTRA	Temperatura		Molaridad Precursor SeNaO			Cantidad mL Extracto Planta		Cantidad Gotas Acido Ascórbico	
	60 c	0 C	1 mM	5 mM	10 mM	1	2	1	2
Se 1	x		x			x		x	
Se 2		x	x			x		x	
Se 3	x		x			x			x
Se 4		x	x			x			x
Se 5	x		x				x	x	
Se 6		x	x				x	x	
Se 7	x		x				x		x
Se 8		x	x				x		x
Se 9	x			x		x		x	
Se 10		x		x		x		x	
Se 11	x			x		x			x
Se 12		x		x		x			x
Se 13	x			x			x	x	

Se 14		X		X			X	X	
Se 15	X			X			X		X
Se 16		X		X			X		X
Se 17	X				X	X		X	
Se 18		X			X	X		X	
Se 19	X				X	X			X
Se 20		X			X	X			X
Se 21	X				X		X	X	
Se 22		X			X		X	X	
Se 23	X				X		X		X
Se 24		X			X		X		X

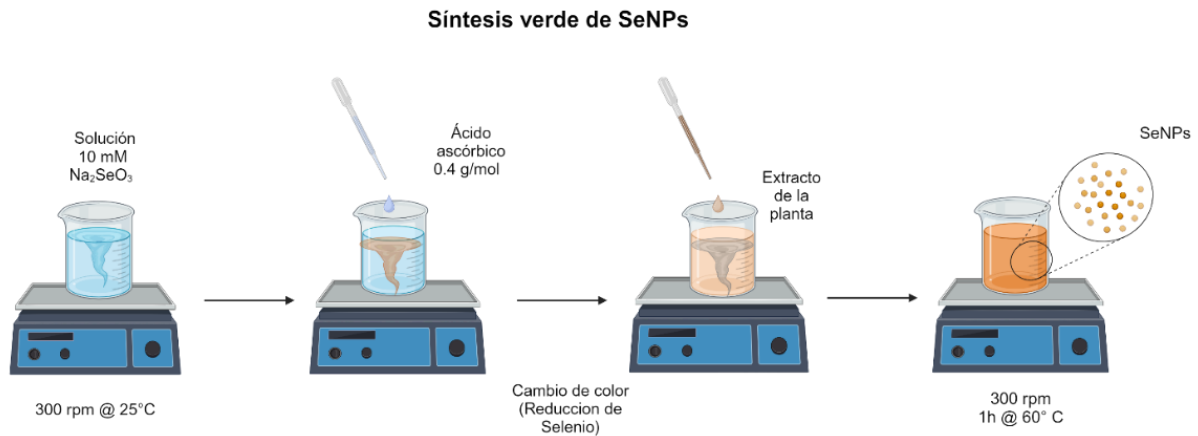
**Tabla 9:** Muestras que cumplen con los resultados para obtener SeNPs viables.

# Muestra	Longitud de onda UV-VIS	Potencial Z (mv)	Tamaño de partícula			
			Vol Mayor %	Tamaño (nm)	Vol Menor %	Tamaño (nm)
Se 1	254.02	3.4	69.9	374	30.1	89.8
Se 2	244.5	58.3	71	24.25	27.1	24.25
Se 3	251.92	19.5	87.2	174.2	10.6	25.93
Se 4	252	31.7	93.3	30.1	6.7	417
Se 5	254.5	16.9	71	103.2	29	326
Se 6	255	32.4	62.9	16.66	26	358
Se 7	253.5	3.6	92.9	306	7.1	42.2
Se 8	255.07	13.2	43.1	42.1	32	106.6
Se 9	260.31	22.3	55.4	415	40.1	2043
Se 10	255	0.5	79.8	94.3	20.2	260.1
Se 11	261.89	57.5	73.7	48	26.3	427
Se 12	258	21.9	84.3	11.37	15.7	68.7
Se 13	N/A	16.3	94.3	24.9	4	107.4
Se 14	N/A	50.3	77	2445	23	23.77
Se 15	252.4	0.5	54.6	68.2	44.1	328
Se 16	NA	0.5	72.7	4090	72.7	1420
Se 17	244.58	14.1	44.5	63.6	42.3	489
Se 18	250.87		91.5	46.3	7.4	175
Se 19	261.89	43.5	100	52.7	0	0
Se 20	261.36	12	95.8	20.16	4.2	1622
Se 21	245.63	0.5	50.4	530	47.4	75.1
Se 22	252.97	0.5	78.2	41.8	21.8	482
Se 23	248.78	50.3	77	2445	23	23.77
Se 24	NA	0.5	78.3	864	21.7	20.94

En la tabla 10 se muestran las muestras que mejor cumplen con las especificaciones. A las muestras 2, 4, 6, 11 y 19 por tener los mejores resultados, sin embargo, la muestra 19 obtuvo mejores resultados en el tamaño de partícula, por lo que se decidió a utilizar dicha metodología. La cual se describe a continuación:

## Método utilizando solución de $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 10 mM

Se agregó 0.1 mL de ácido ascórbico 1 M y 1 mL de extracto acuoso (gota a gota) de *P. Sericea* en 10 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  10 mM a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , manteniéndose en agitación constante por 1 hora hasta que la solución cambio a color amarillo. Finalmente se almacena y se deja reposar 24 h, obteniendo un color naranja, que indica la formación de SeNPs. Figura 35 y 36.



**Figura 35:** Síntesis verde de nanopartículas de selenio



**Figura 36:** Solución coloidal de SeNPs

## **4.5 Caracterización de SeNPs**

El análisis de la solución coloidal de SeNPs se analizó por triplicado, los parámetros utilizados en cada técnica se describen a continuación:

### **4.5.1 Espectroscopia UV-Vis**

Con la técnica de espectroscopia UV-Visible, se corroboró la presencia de las SeNPs en solución coloidal, se tomó 1 mL de alícuota y se colocó en una celda de cuarzo, a la cual se le adicionó solución agua-etanol a 50% v/v hasta un volumen de 4 mL y se agitó suavemente. Se estableció el rango de longitud de onda de 200 a 800 nm abarcando el espectro ultravioleta y visible, con una resolución de 1 nm en el Espectrofotómetro UV Perkin Elmer UV/Vis Lambda 365. Se limpió una celda de cuarzo y se procedió a hacer la línea base con el blanco. Se realizó la medición de la muestra y se procedió a los análisis pertinentes.

### **4.5.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)**

Con la técnica de DLS se realizó la medición de la distribución del tamaño de partícula y su estabilidad coloidal, especialmente en el rango de 2-500 nm, debido a la medición del radio hidrodinámico. Se empleó el Nanotracs Wave II de Microtracs MRB para medir tamaño, potencial zeta y dispersión de la muestra. Se utilizó la cantidad necesaria (0.2 mL aproximadamente) y se colocó en el porta muestras. Se introdujeron los datos y parámetros que se requirieron de acuerdo con el equipo y se procedió a su medición.

### **4.5.3 Espectroscopía infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)**

Para corroborar la existencia de los grupos funcionales presentes en la solución coloidal de Nanopartículas de selenio, se realizó FT-IR para las diferentes muestras. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro FT-IR (Perkin Elmer, Frontier), para ello se depositó una gota del extracto en el cristal del aditamento ATR (Attenuated Total

Reflectance). Se dejó evaporar el solvente y posteriormente, la muestra fue analizada en un rango de longitud de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  a una velocidad de paso de 0.5  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.5.4 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**

La Estructura tridimensional y rugosidad de las SeNPs fue analizada por AFM marca Park. Primeramente, se preparó el sustrato, el cual consistió en cortar de una hoja de vidrio de 1x1 cm, esta se limpió con acetona, etanol y posteriormente agua destilada y finalmente se secó con aire comprimido para quitar cualquier tipo de contaminante. Posteriormente se colocó en una centrifuga el vidrio, y sobre este se añadieron 2 gotas de solución coloidal de SeNPs. La solución evaporada de SeNPs, fue analizada por AFM a temperatura ambiente.

#### **4.5.5 Microscopia electrónica de barrido y electrones dispersos de rayos X (SEM y EDS).**

Para el análisis de la morfología (tamaño y forma) de las SeNPs se utilizó la técnica de SEM. Y para el análisis de la composición química elemental se utilizó la técnica EDS. Para esto se tomó una muestra de 1.5 mL de solución coloidal, se centrifugo por 10 min a velocidad de 10,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregó nuevamente agua destilada, este proceso se llevó a cabo 3 veces. Las muestras se analizaron colocando una gota de la solución coloidal en un portaobjetos de grafito, se dejó evaporar el solvente y se realizó el análisis correspondiente con el equipo marca (Quanta 250) utilizando un voltaje de 10 kV con un aumento de 5000x y 10000x.

#### 4.5.6 Análisis microbiológico

Para el análisis de las propiedades antimicrobianas se preparó el inóculo de las cepas bacterianas. El inóculo se dejó incubando 24 h con un ajuste de densidad óptica de 0.05 con Lector de Elisa con caldo de soya. Se prepararon cajas de Petri con 15ml de agar nutritivo. Se inocularon las cajas de cultivo con un hisopo con las bacterias *S. aureus* y *E. coli*. Posteriormente se establecieron cuatro cuadrantes en los cuales se realizaron los pozos con un sacabocados. Una vez inoculadas se prosiguió a suministrar 40 µl de las muestras en los pozos correspondientes dejando humectar durante 1 h para finalmente dejar incubando durante 24 h a 37 °C. Se utiliza agua destilada estéril como control negativo. Después del tiempo, se midieron los halos de inhibición con vernier escala milimétrica y se obtuvieron datos estadísticos.

#### 4.6 FASE 3: Elaboración de películas plásticas a base de biopolímeros

De acuerdo a su composición, se procedió a realizar 4 mezclas para fabricar las películas plásticas (tabla 11), las cuales se elaboraron utilizando quitosano con el mejor peso molecular obtenido, el cual corresponde a la muestra 2.

**Tabla 10** Tipos de películas bioplásticas realizadas.

Muestra	Composición
Q	Quitosano 100%
Q/Se	Quitosano 100%, nanopartículas de selenio 0.05%
Q/PVA	Quitosano 50%, Alcohol polivinílico 50%
Q/PVA/Se	Quitosano 50%, Alcohol polivinílico 50%, nanopartículas de selenio 0.05%

#### 4.6.1 Procedimiento

Para la elaboración de cada una de las películas plásticas, se prepararon 3 soluciones distintas, las cuales se describen a continuación:

- Solución de ácido cítrico al 1% wt/v (10 min a 25 °C)
- Solución de quitosano al 2% wt/v (1 h a 60 °C)
- Solución de PVA al 1% wt/v (1 h a 80 °C)

Posteriormente se elaboró cada una de las muestras con sus respectivos porcentajes de composición añadiendo glicerol al 0.5% wt/v como plastificante, siguiendo los siguientes procedimientos:

1. Muestra Q:

- Solución de quitosano 2wt%
  - Glicerol 0.5%
- } 1 h a 25°C

2. Muestra Q/Se

- Solución de quitosano 2% wt/v
  - Glicerol 0.5% wt/v
  - SeNPs coloidal 0.05% wt/v
- } 1 h a 25°C

3. Muestra Q/PVA

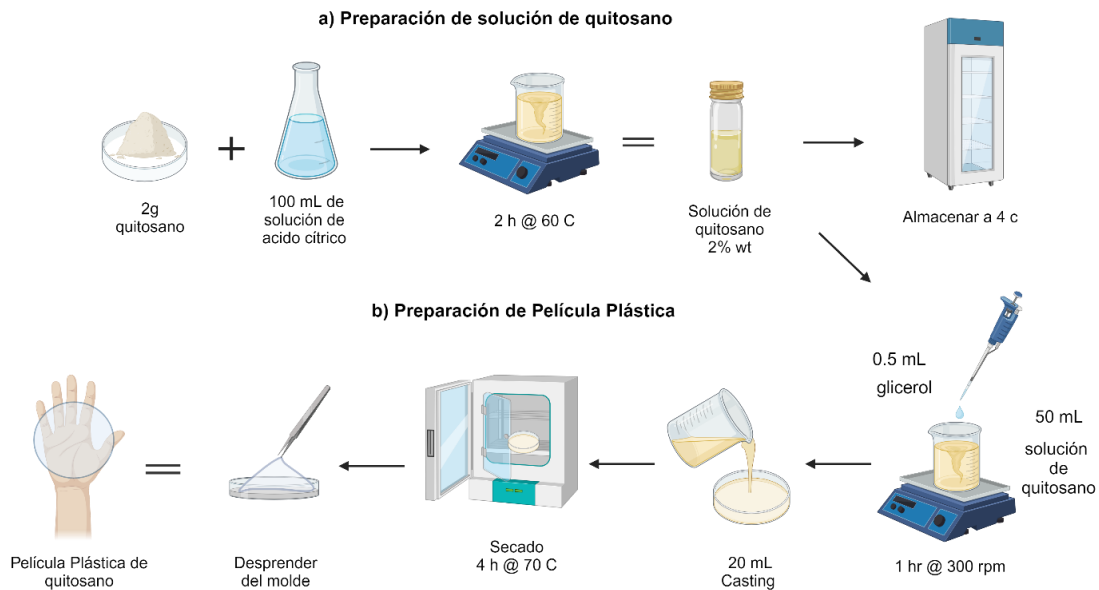
- Solución de quitosano 2wt% wt/v
  - Solución de PVA 2% wt/v
  - Glicerol 0.5% wt/v
- } 1 h a 50°C

4. Muestra Q/PVA/Se

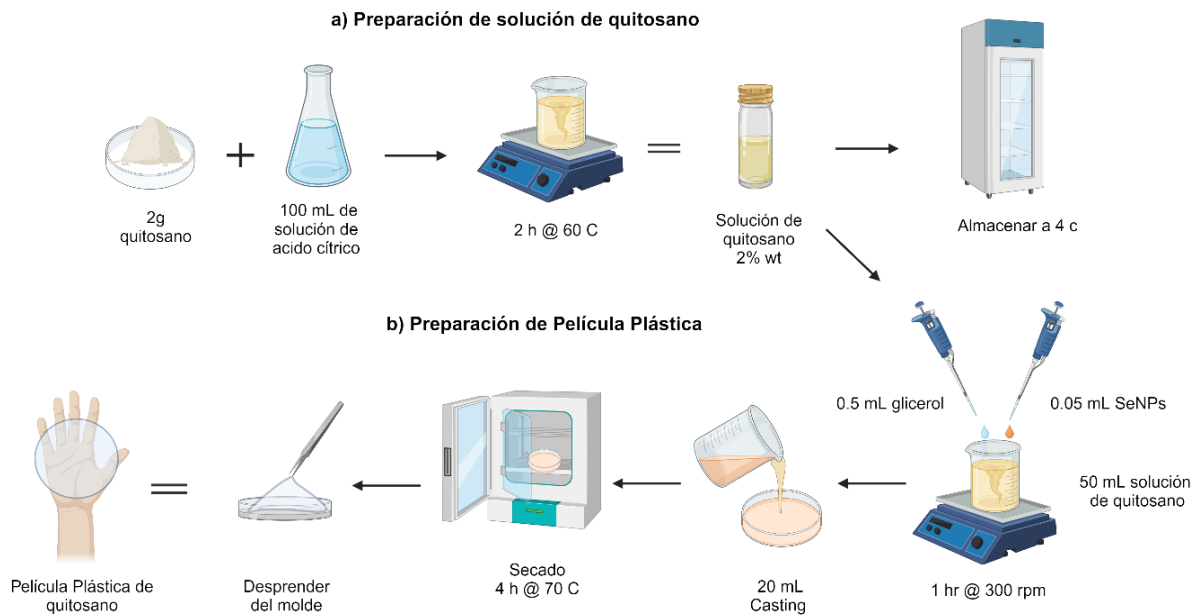
- Solución de quitosano 2% wt/v
  - Solución de PVA 2% wt/v
  - Glicerol 0.5% wt/v
  - SeNPs coloidal 0.05 wt% wt/v
- } 1 h a 50°C

Finalmente, para su elaboración se utilizó el método de casting, y se procedió a colocar 20 mL de cada una de las soluciones en moldes de poliestireno cristal circulares de

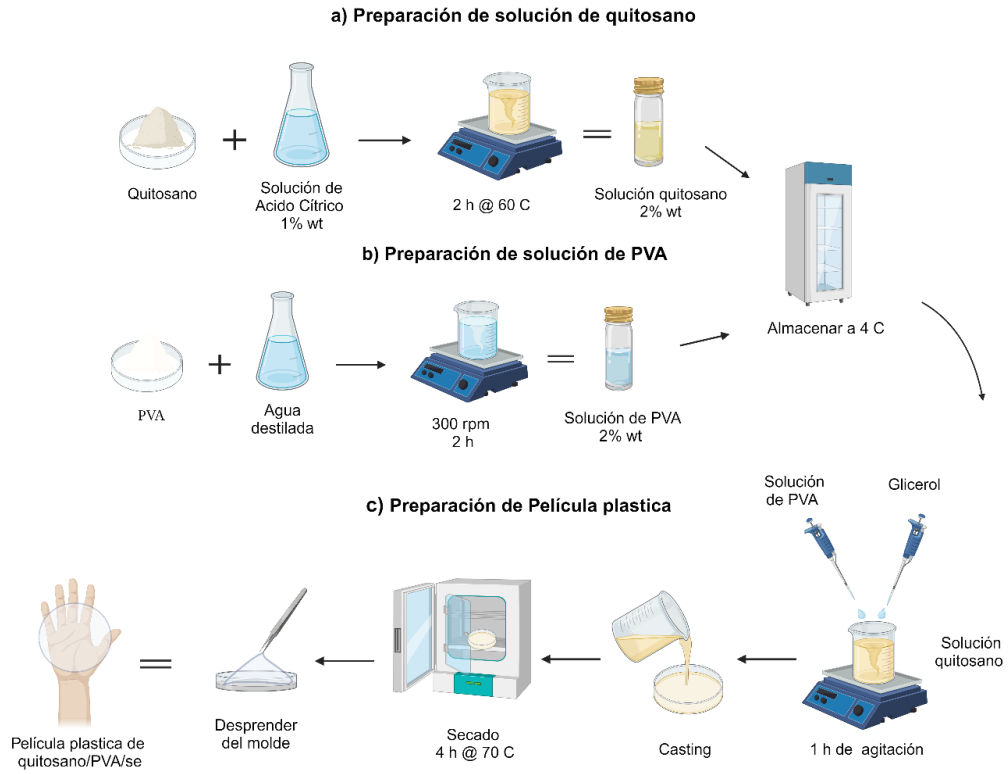
diámetro de 90 x 15 mm (cajas Petri), y se metieron al horno de aire por 4 horas a 70°C para la evaporación del solvente, finalmente se dejaron en el desecador por 24 horas. Cada uno de los procedimientos para las distintas películas plásticas se describen en las figuras 37, 38, 39 y 40.



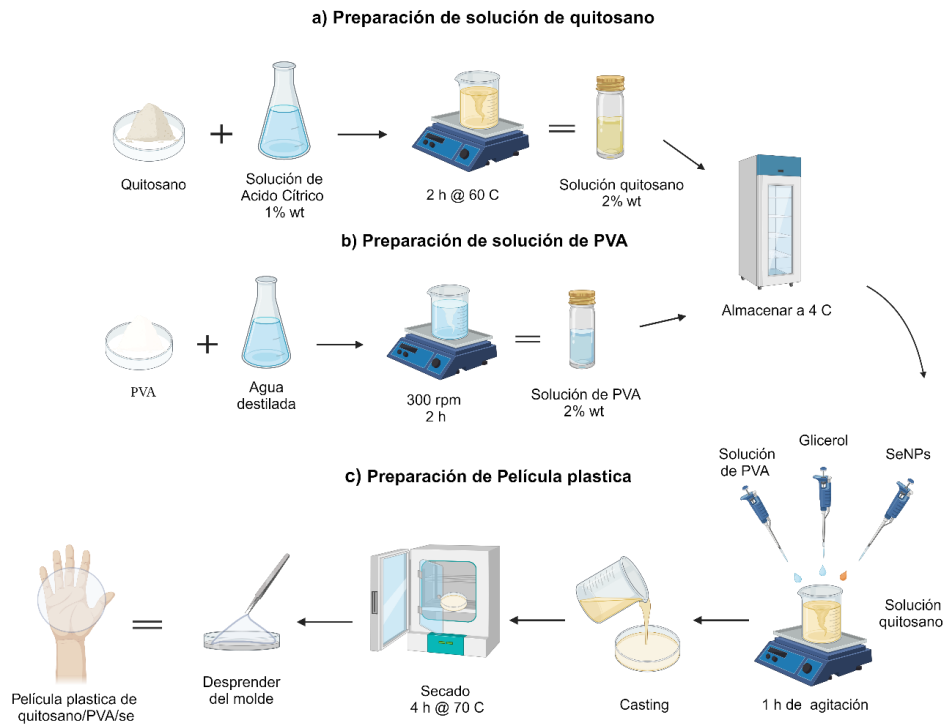
**Figura 37** Elaboración de película plástica de quitosano



**Figura 38** Elaboración de película plástica Q/Se.



**Figura 39** Elaboración de película plástica Q/PVA



**Figura 40** Elaboración de película plástica Q/PVA/Se

## **4.7 Caracterización de películas plásticas a base de biopolímeros**

Se caracterizaron los 4 tipos de películas plásticas elaboradas, para conocer sus propiedades, físicas y químicas, a continuación, se describen cada uno de las pruebas de caracterización.

### **4.7.1 Espesor de las películas plásticas**

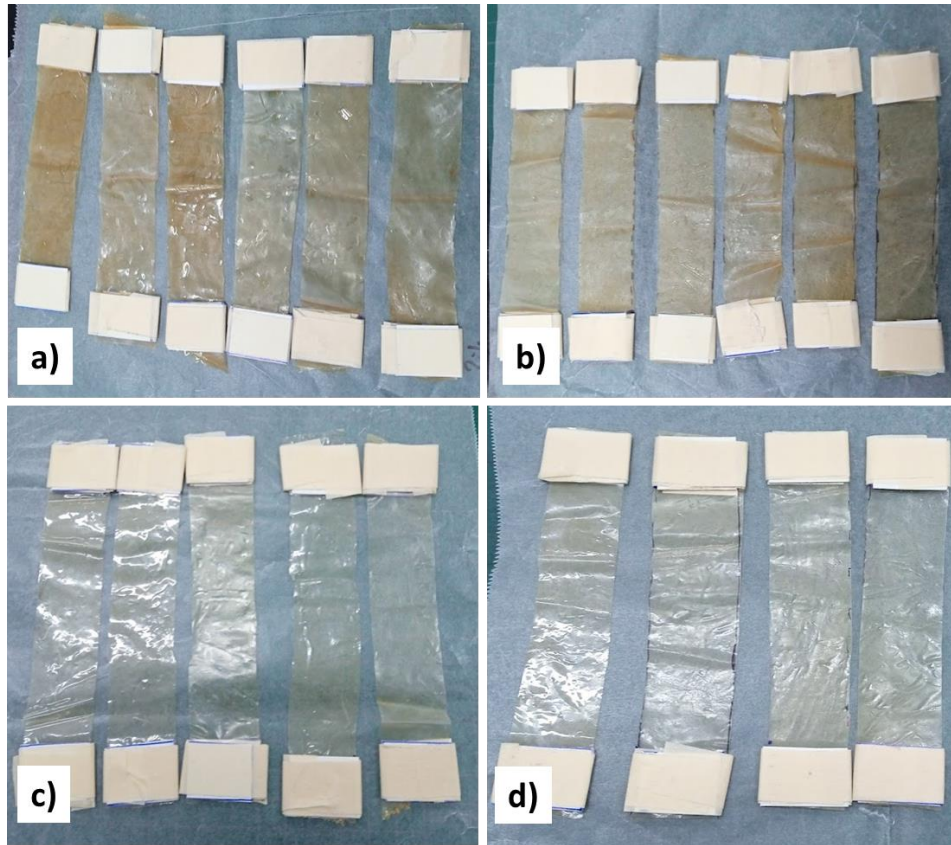
Se determinó el espesor de las 4 películas plásticas utilizando un Vernier (Mitutoyo), con una precisión de 0.01 mm, el espesor se determinó colocando en 3 diferentes lugares del material teniendo como resultado el promedio de estas mediciones.

### **4.7.2 Densidad Aparente**

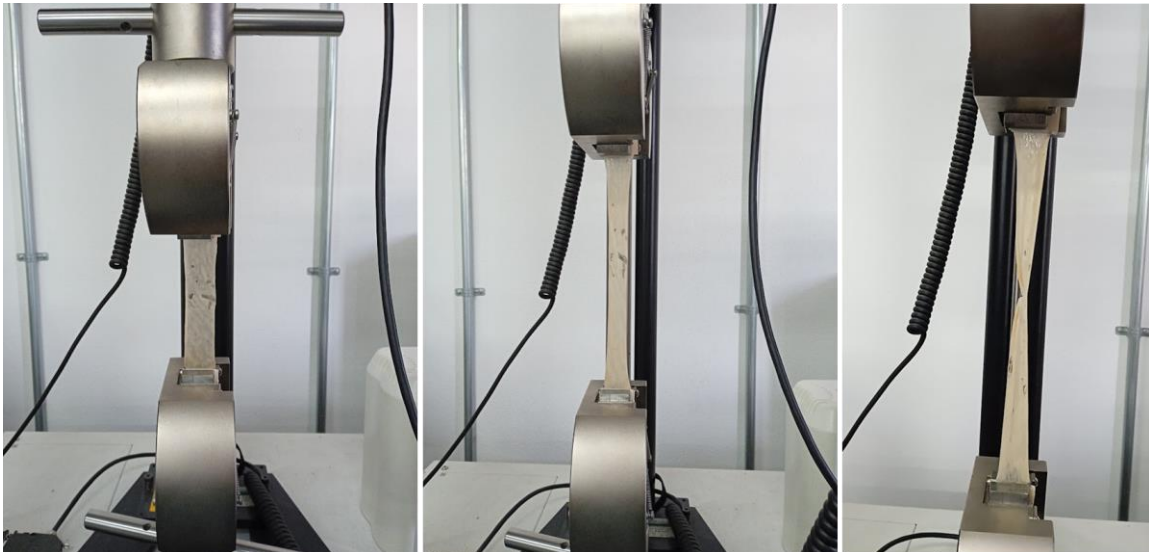
Para conocer la densidad aparente de las películas plásticas, las muestras con espesores similares, fueron cortadas en círculos de diámetro de 1 cm, y posteriormente se pesaron en una balanza analítica. La densidad aparente de las películas fue obtenida con la ecuación correspondiente.

### **4.7.3 Pruebas mecánicas**

Las propiedades mecánicas tales como el esfuerzo de tracción (TS), elongación a la rotura (EB) y el módulo de Young (YM) fueron determinados mediante la prueba de tracción siguiendo la norma ASTM D882-18 <sup>[124]</sup> en el equipo INSTRON Bluehill a una velocidad de 10mm/min. Se cortaron 5 probetas (figura 41) de cada material con dimensiones de 25mm de ancho por 140mm de largo, con una distancia entre mordazas de 100mm y una medida de agarre de mordazas de 20mm de cada lado (figura). El TS y la EB fueron calculados con la curva TS vs. EB; y el módulo de Young con el coeficiente angular de dichas curvas. En la figura 42, se observa la prueba mecánica en proceso.



**Figura 41:** Probetas para pruebas mecánicas.



**Figura 42:** Prueba mecánica en proceso.

#### **4.7.4 Porcentaje de contenido de humedad, grado de hinchabilidad y solubilidad**

El cálculo del contenido de humedad (MC), el grado de hinchabilidad (SP) y la solubilidad (S) de las películas plásticas se realizó como se describe a continuación: se tomaron 5 piezas de la película de quitosano (2 cm<sup>2</sup>) y se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente las piezas se secaron en un horno marca Shel Lab a 100 °C por 24 h, al finalizar se pesaron de nuevo. Las muestras secas fueron inmersas en vasos de precipitados con 50 mL de agua destilada, donde se quedaron por 24 h con agitación ocasional a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo, las muestras fueron filtradas con papel filtro Whatman #1 y se pesaron nuevamente. Finalmente, cada pieza fue secada a 100 °C por 24 h, y el peso final fue obtenido. Los valores de MC%, SP% y S%, fueron calculados de acuerdo con sus respectivas ecuaciones <sup>[125]</sup>.

#### **4.7.5 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Para determinar los grupos funcionales y la interacción que hay entre el plastificante y los biopolímeros utilizados en las películas plásticas, las muestras fueron analizadas mediante FTIR-ATR utilizando un equipo marca Perkin Elmer Spectrum One. El análisis se llevó a cabo en un rango de 4000-400 cm<sup>-1</sup> a una velocidad de barrido de 0.5 cm<sup>-1</sup>/s a temperatura ambiente. Los espectros resultantes fueron comparados con muestras de quitosano comercial (Sigma Aldrich).

#### **4.7.6 Análisis Térmico (DSC)**

La DSC de barrido se llevó a cabo con el equipo TA Instruments DSC Q2000 en el cual una muestra de 1mg de quitosano fue colocado en un crisol de acero inoxidable y fue sellado herméticamente a presión. Las muestras fueron calentadas de los 30 °C hasta los 900 °C en rampas de 20 °C por minuto, en presencia de una atmósfera inerte de nitrógeno.

#### **4.7.7 Análisis Termogravimétrico (TGA)**

Para el TGA de las muestras de quitosano, se utilizó el equipo TA Instruments Q500. Donde se colocó 1 mg de quitosano en un contenedor de platino bajo un flujo constante en una atmósfera de nitrógeno, con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min en un rango de temperatura de 25-900 °C.

#### **4.7.8 Análisis Morfológico y elemental**

Para analizar la morfología de la superficie de la de las películas plásticas a base de biopolímeros se utilizó la técnica de SEM con un equipo marca (Quanta 250) utilizando un voltaje de 10 kV con un aumento de 5000x. El polvo de quitosano fue recubierto con una fina capa de Au utilizando recubrimiento por pulverización catódica. Mientras que para la muestra de quitina se utilizó el equipo: Lyra 3 Tescan, utilizando un voltaje de 15 kV con un aumento de 5000x, sin ningún tipo de recubrimiento. Posterior al escaneo, las composiciones elementales de las muestras fueron sometidas al análisis EDX utilizando los detectores acoplados en los respectivos microscopios antes mencionados.

#### **3.7.10 Actividad antimicrobiana**

Para el análisis de las propiedades antimicrobianas se preparó inóculos individuales en caldo soya tripticaseina (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) de colonias frescas de las cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (ATCC 25922). El inóculo se dejó incubando por 24 h a 37 °C en condiciones aerobias. Posteriormente, cada inóculo se ajustó a una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  UFC/mL en caldo de soya tripticaseina. A continuación, se sembraron 0.1 mL de cada uno de los inóculos en agar soya tripticaseina (15 mL de líquido por cada de Plato Petri de 100 mm). Después de 30 min de siembra, se colocaron 4 piezas circulares (10 mm de diámetro) sobre las superficies de agar soya tripticaseina inoculadas y se incubaron por 24 h a 37 °C. Finalmente, se montó cada plato de agar en un contador de colonias de campo oscuro (Reichert, NY, NY, USA) para

digitalizarlos, se midieron los halos de inhibición con vernier escala milimétrica, y se graficaron las medias con desviación estándar.

#### **4.7.11 Biodegradabilidad en el medio ambiente**

Para conocer la degradación o deterioro de las películas plásticas en el suelo (tierra), 3 muestras de cada tipo de película plástica de 1 cm<sup>2</sup> fueron previamente pesadas y después enterradas por 15 días en contenedores de PET de tamaño de 4 cm de diámetro por 3 de alto, con tierra con 45-50% materia orgánica, 25% de agua y 1% materia inorgánica a 1.5 cm de profundidad. Diariamente se le roció agua a cada uno de los contenedores para mantener la tierra húmeda, para evitar que el agua se quedara estancada, a cada uno de los contenedores se le realizó un pequeño orificio en la parte de abajo para drenar el agua. Al término de la prueba, las muestras fueron extraídas con cuidado con una pinza y fueron pesadas, para obtener la pérdida de peso final.

#### **4.7.12 Aplicación como empaque alimenticio**

Se analizó la habilidad de la película plástica como empaque alimenticio, evaluando su efectividad al ser utilizadas como protección en uvas verdes. Se utilizaron como envoltura en uvas verdes de tamaño mediano (1.4 cm de diámetro) y un peso promedio de 11 g. De igual forma se envolvieron 3 uvas con película plástica comercial 3 uvas se dejaron sin envoltura, para tener un comparativo del comportamiento de los materiales. Cada una de las uvas envueltas fue colocada separadamente en cajas Petri esterilizadas a temperatura ambiente (24-25 °C) durante 15 días. Diariamente se hizo una evaluación visual de las uvas, donde se incluía, olor, textura y color, clasificándolas en 3 categorías, buena, regular o mala.

#### **4.7.13 Pérdida de peso de las uvas**

Se registró diariamente la pérdida de peso de las uvas. Posteriormente, se calculó el porcentaje radio (%) de pérdida de peso, utilizando los cálculos pertinentes.

#### **4.7.14 Acidez total**

Para obtener la acidez total de la fruta, se obtuvo el jugo de cada una de las uvas, a 1 mL de jugo de uva, se le añadieron 9 mL de agua destilada, y se tituló con NaOH 0.1 M. Finalmente se calculó el resultado.

#### **4.7.15 Solidos totales solubles**

Cada una de las uvas que estuvieron envueltas con las películas plásticas, se les extrajo el jugo, utilizando bolsas de plástico de polipropileno esterilizadas con cierre hermético, las uvas se metieron a las bolsas y estas se comprimieron manualmente hasta obtener su jugo. Se tomó 0.5 mL de este jugo y se analizó el índice de refracción con un refractómetro, una vez obtenido ese dato, se calculó el porcentaje Brix (%), para obtener la madurez de las uvas, utilizando su respectiva ecuación.

# CAPITULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## 5. Resultados

En este capítulo se describen los resultados obtenidos a través de las técnicas de caracterización respectivas a cada una de las fases del desarrollo de las películas plásticas a base de biopolímeros de Q y/o PVA y/o adicionados con SeNPs. La fase 1 describe las propiedades de Q extraído tanto físicas como químicas, siguiendo a la fase 2, que corresponde a los resultados obtenidos de las SeNPS sintetizadas por ruta verde por medio del extracto acuoso de *P. Sericea* y finalmente en la fase 3 se analizan las propiedades físicas y químicas del producto final (película), que son las 4 diferentes películas bioplásticas realizadas, las cuales son: Quitosano, Quitosano/PVA, Quitosano/SeNPs y Quitosano/PVA/SeNPs.

### 5.1 Fase 1: Quitosano

Los resultados de las propiedades fisicoquímicas del quitosano extraído y quitosano comercial (Sigma Aldrich) se describen a continuación:

#### 5.1.1 Determinación de Peso Molecular mediante viscosimetría

Los resultados de los ensayos de viscosimetría que se le realizaron a las 4 muestras y a muestras de quitosano comercial, por sextuplicado se muestran en la Tabla 12, así como los parámetros establecidos para las soluciones patrón (Tabla 13) y las constantes utilizadas (tabla 14) para aplicarlo en las ecuaciones anteriormente presentadas.

**Tabla 11** Parámetros de solución patrón

Cantidad quitosano (g)	Solvente (mL)	Concentración Solvente (g/mL)
0.2	100	0.002

**Tabla 12** Constantes correspondientes a quitosano.

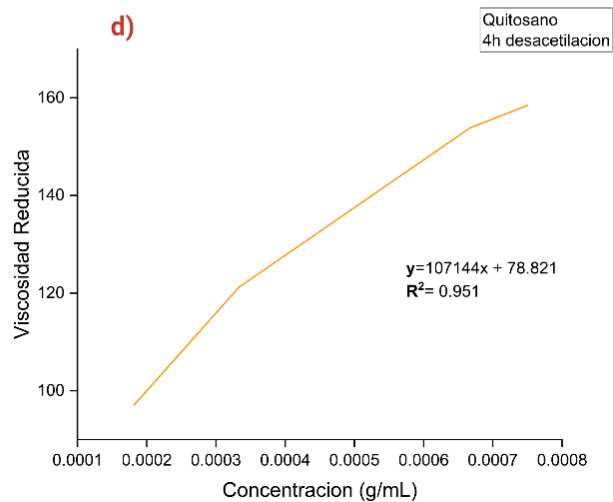
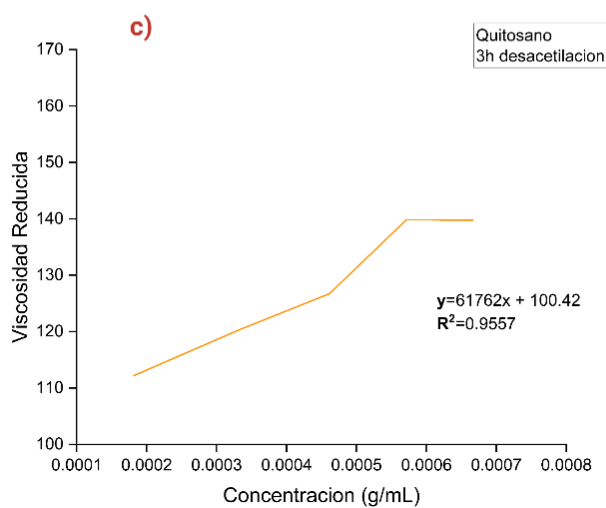
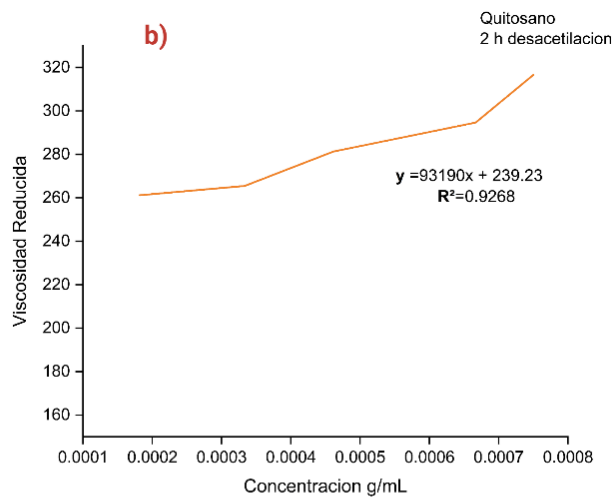
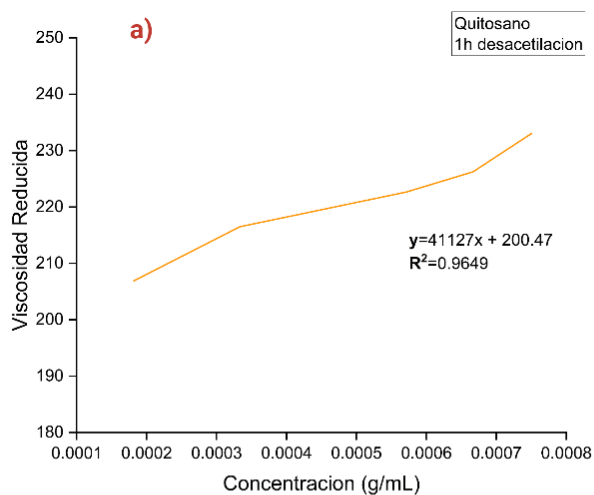
Constantes Quitosano	
K	0.014 g/ mL
$\alpha$	0.83

**Tabla 13:** Ensayos de viscosimetría realizados a las muestras de quitosano.

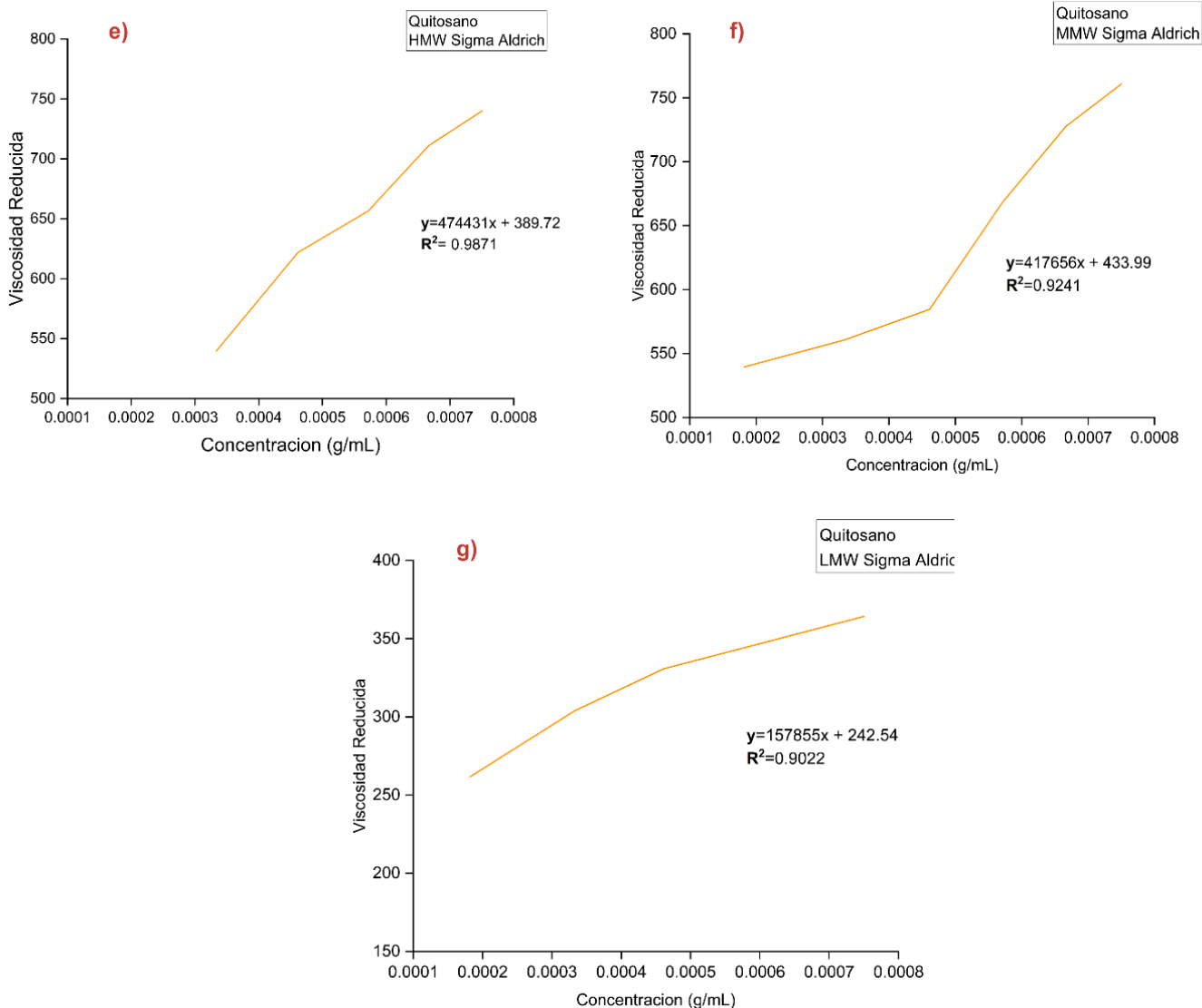
Muestra de quitosano	Concentración (g/mL)	Viscosidad Relativa	Viscosidad Específica	Viscosidad Reducida (mL/g)
Q/4h	0.00018	1.01766	0.01766	97.11375
	0.00033	1.04041	0.04041	121.22241
	0.00046	1.05535	0.05535	119.92077
	0.00057	1.06486	0.06486	113.49745
	0.00067	1.10255	0.10255	153.82003
	0.00075	1.11885	0.11885	158.46067
Q/3h	0.00018	1.02040	0.02040	112.20673
	0.00033	1.04012	0.04012	120.36722
	0.00046	1.05848	0.05848	126.71427
	0.00057	1.07990	0.07990	139.83339
	0.00067	1.09317	0.09317	139.74838
	0.00075	1.12411	0.12411	165.47660
Q/2h	0.00018	1.04749	0.04749	261.18893
	0.00033	1.08849	0.08849	265.45951
	0.00046	1.12983	0.12983	281.28915
	0.00057	1.13324	0.13324	233.17390
	0.00067	1.19645	0.19645	294.67031
	0.00075	1.23744	0.23744	316.59264
Q/1h	0.00018	1.03762	0.03762	206.90834
	0.00033	1.07216	0.07216	216.48427
	0.00046	1.08824	0.08824	191.17647
	0.00057	1.12722	0.12722	222.64022
	0.00067	1.15082	0.15082	226.23119
	0.00075	1.17476	0.17476	233.01414
HMW Sigma	0.00018	1.11365	0.11365	625.08532
	0.00033	1.17986	0.17986	539.59044
	0.00046	1.28703	0.28703	621.89989
	0.00057	1.37509	0.37509	656.39932
	0.00067	1.47406	0.47406	711.09215
	0.00075	1.55495	0.55495	739.93174
MMW Sigma	0.00018	1.09808	0.09808	539.43759

	0.00033	1.18690	0.18690	560.69959
	0.00046	1.26989	0.26989	584.76223
	0.00057	1.38203	0.38203	668.55281
	0.00067	1.48525	0.48525	727.88066
	0.00075	1.57064	0.57064	760.85963
<b>LMW Sigma</b>	0.00018	1.04759	0.04759	261.72544
	0.00033	1.10134	0.10134	304.00548
	0.00046	1.15269	0.15269	330.82278
	0.00057	1.18281	0.18281	319.92468
	0.00067	1.22835	0.22835	342.51969
	0.00075	1.27319	0.27319	364.25882

Posteriormente al obtener cada uno de los ensayos viscosimétricos, se obtuvieron las regresiones lineales de los puntos de viscosidad reducida en función de la concentración de cada una de las muestras de quitosano con diferentes tiempos de desacetilación figura 43 a) 1h, b) 2h, c) 3h y d) 4h. se observan las regresiones lineales de las muestras extraídas con diferentes tiempos de desacetilación, las muestras de quitosano comercial Sigma Aldrich se muestran en la figura 44, donde e) Alto peso molecular, f) Medio peso molecular y g) bajo peso molecular.



**Figura 43** Regresión lineal de los puntos de viscosidad en función de la concentración (g/mL) de las muestras de quitosano extraído a diferentes tiempos de desacetilación. a) 1h, b) 2h, c) 3h d) 4h.



**Figura 44** Regresión lineal de los puntos de viscosidad en función de la concentración (g/mL) de las muestras de quitosano comercial. e) alto peso molecular f) medio peso molecular g) bajo peso molecular.

Finalmente, el peso molecular para cada muestra extraída a diferentes tiempos de desacetilación fueron calculadas por medio de la viscosidad intrínseca y los resultados se muestran en la Tabla 15. Teniendo como referencia los datos de Sigma Aldrich para pesos moleculares de quitosano, los de bajo ( $1,000 \text{ g/mol} \leq Mw \leq 10,000 \text{ g/mol}$ ), medio ( $10,000 \text{ g/mol} < Mw \leq 250,000 \text{ g/mol}$ ) y alto ( $Mw > 250,000 \text{ g/mol}$ ) peso molecular [126,127]. Lo que indica que es adecuado para aplicaciones en empaque de alimentos debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, bioactividad y baja toxicidad, comparado con

quitosano de alto peso molecular [126,128,129]. El tiempo de desacetilación influye en el peso molecular ya que la solución alcalina (NaOH) siempre y cuando se mantenga la misma concentración y la misma temperatura. Si el tiempo sobrepasa 1 hora el álcali causa la destrucción de las moléculas del polisacárido lo que lleva a reducir el peso molecular considerablemente, entre 2 y 3 más el peso se reduce de 1.5 -2 veces, se ha demostrado que después de ese tiempo, de 3 h en adelante el peso molecular puede reducirse hasta 10 veces [130].

**Tabla 14** Resultados obtenidos de Viscosidad Intrínseca y Peso molecular de las muestras de quitosano comercial y extraído a diferentes tiempos de desacetilación.

Material	Viscosidad Intrínseca [ $\eta$ ] (dL/g)	Peso Molecular (g/mol)
<i>Q/4h</i>	78.52	$3.29 \times 10^4$
<i>Q/3h</i>	100.42	$4.42 \times 10^4$
<i>Q/2h</i>	239.23	$1.26 \times 10^5$
<i>Q/1h</i>	200.47	$1.02 \times 10^5$
<i>HMW Sigma</i>	389.72	$2.58 \times 10^5$
<i>MMW Sigma</i>	433.99	$2.26 \times 10^5$
<i>LMW Sigma</i>	242.54	$1.28 \times 10^5$

### 5.1.2 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En este trabajo determinamos la pureza de la quitina y Q extraído por medio de FTIR. Se realizó un comparativo con 3 muestras de Q comercial (Sigma Aldrich), con bajo, medio y alto peso molecular. En la figura 45 se observan los espectros de quitosano comercial de distintos pesos moleculares y en la figura 46 se tienen los espectros de quitosano extraído en diferentes tiempos de desacetilación y finalmente en la figura 47 se tienen los espectros de quitina, quitosano comercial de bajo peso molecular y quitosano extraído a 2 horas de des acetilación (la muestra con mejores propiedades para aplicaciones en películas plásticas).

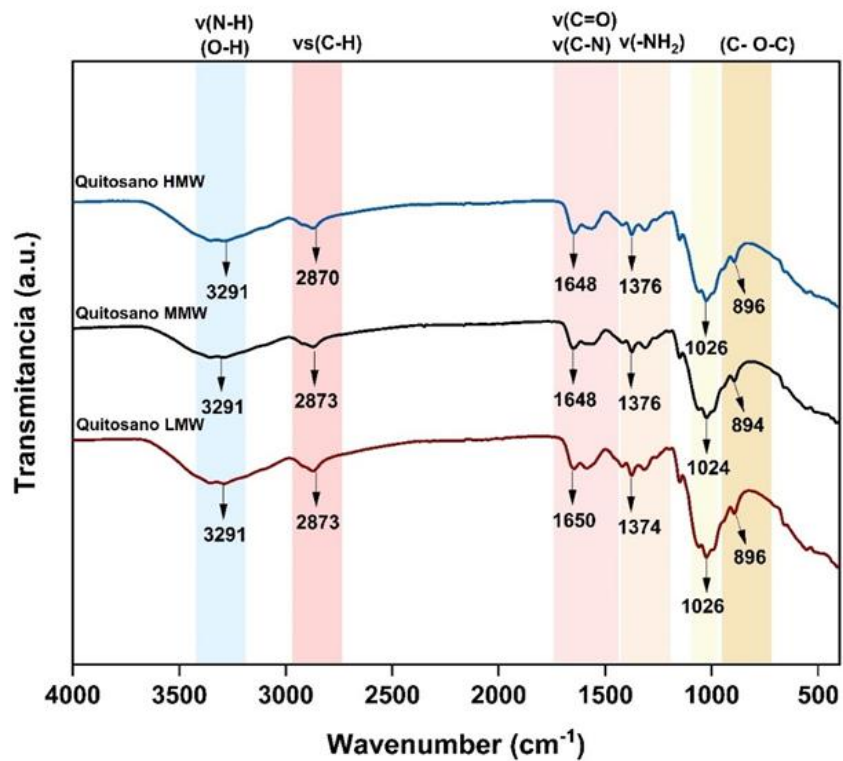


Figura 45: Espectros de Q comercial a distintos pesos moleculares

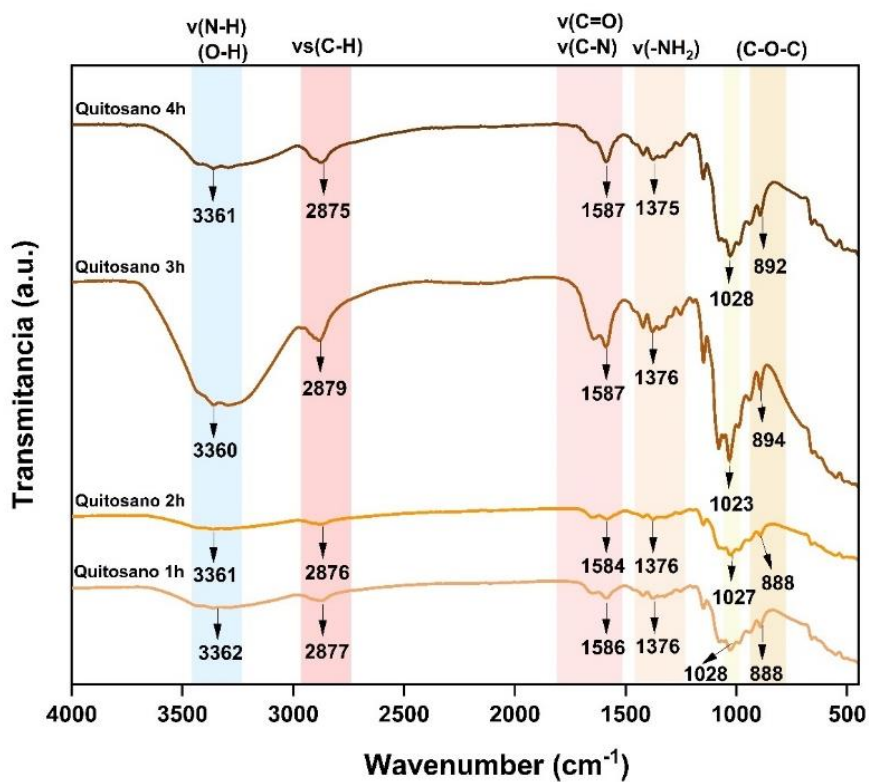
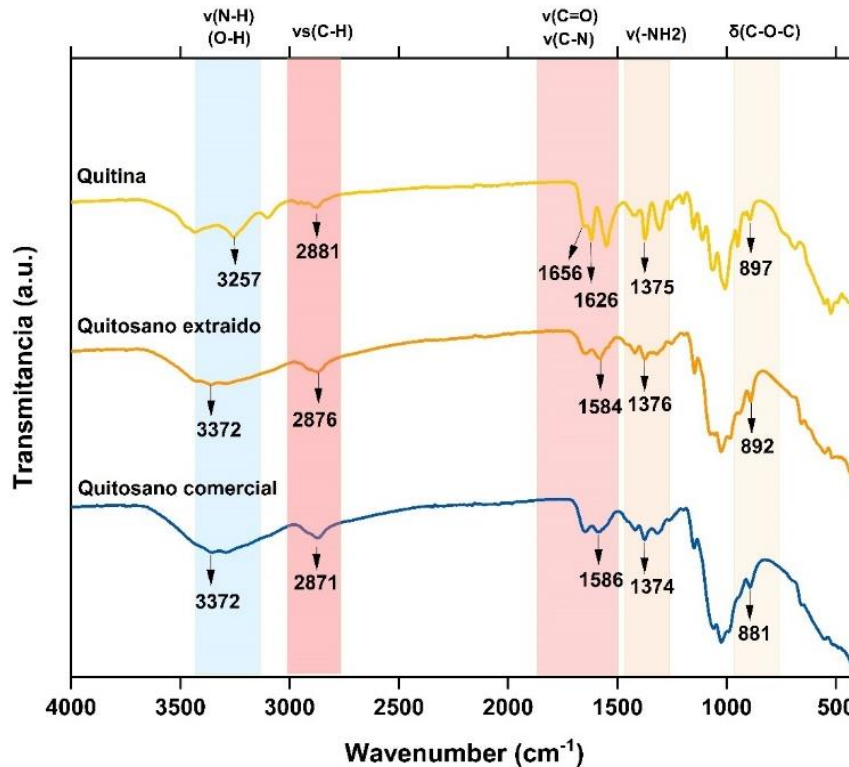


Figura 46: Espectros de Q extraído a diferentes tiempos de desacetilación.



**Figura 47:** Espectros comparativos entre quitina, Q comercial a bajo peso molecular y Q extraído por 2 h de desacetilación.

Para la quitina, el espectro exhibe bandas en  $3257\text{ cm}^{-1}$  y  $2881\text{ cm}^{-1}$ , que son asignadas a vibraciones de estiramiento en NH y O-H <sup>[131]</sup>. Las bandas de  $1656\text{ cm}^{-1}$  y  $1626\text{ cm}^{-1}$  son asignadas a vibraciones de estiramiento en C=O (amida I) y C-N (amida II), respectivamente. También, están presentes las bandas en  $1552\text{ cm}^{-1}$  y  $1375\text{ cm}^{-1}$  que son asignadas a vibraciones de estiramiento C=O de enlaces amida II y vibraciones de pandeo de enlaces amida -NH<sup>2</sup>. Por último, una banda en  $897\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo CH del anillo piranosa <sup>[132]</sup> y del anillo glicosídico del polisacárido <sup>[133]</sup>. Es notorio que, las bandas en la región de  $3500\text{-}3350\text{ cm}^{-1}$  están ausentes para el quitosano extraído y comercial, y las bandas en  $1656\text{ cm}^{-1}$  y  $1626\text{ cm}^{-1}$  reducidas considerablemente; lo que demuestra la correcta extracción de quitosano por el método empleado <sup>[134]</sup>. Tanto el quitosano extraído como el comercial presentaron un espectro similar, con bandas en  $3372\text{ cm}^{-1}$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$ , que son asignadas a vibraciones de estiramiento en NH y O-H <sup>[135]</sup>. También están presentes las bandas en  $1586\text{ cm}^{-1}$  y  $1374\text{ cm}^{-1}$  que son asignadas a vibraciones de estiramiento C=O de enlaces amida y

vibraciones de pandeo de enlaces amida  $-NH_2$ . Por último, una banda en  $881\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a vibraciones de estiramiento C-O-C. Esta información sugiere que el método de extracción genera un nivel de pureza similar al control de uso comercial, permitiendo su aplicación como película plástica de empaque en la industria alimenticia.

### 5.1.3 Rendimiento total

Dado que la quitina y quitosano, están presentes en los exoesqueletos del camarón *F. Californiensis* como una fracción en toda la red compleja de la estructura. El porcentaje de rendimiento será bajo ya que anteriores investigaciones enfocadas en otros exoesqueletos de crustáceos delimitan el porcentaje de quitina entre 4-36% y quitosano entre 12-35% a partir de la materia prima. Por ejemplo, para la especie de camarón *Litopenaeus vannamei*, Junior et al. obtuvieron un rendimiento de 36% de quitina (con base a exoesqueletos) <sup>[38]</sup>. Por otra parte, Rakshit et al. obtuvieron un rendimiento de quitina de 23.23% en *Litopenaeus vannamei* <sup>[133]</sup>. Para la especie *Metapeneus monodon*, Alishahi et al lograron 24.33% quitina y 15.25% Q del peso total de las cascarras <sup>[136]</sup>. Finalmente, para la especie *Fenneropenaeus indicus*, Parthiban et al encontraron un rendimiento del 45.14% de Q a partir de la quitina <sup>[137]</sup>. Lo que sugiere que el rendimiento obtenido para el camarón *F. Californiensis*, está dentro del rango establecido <sup>[134]</sup>. En la tabla 16 se tienen los rendimientos de quitina y Q de cada una de las muestras desacetiladas a diferentes tiempos, se observa que entre menos tiempo de desacetilación el rendimiento es mayor tanto en quitina como en quitosano.

**Tabla 15:** Rendimiento de quitina y quitosano a diferentes tiempos de desacetilación.

Muestra	Peso materia prima (g)	Peso quitina (g)	Rendimiento (%)	Peso quitosano (g)	Rendimiento a partir de materia prima (%)	Rendimiento a partir de quitina (%)
<i>Q/4h</i>	50	10.1	20.2	6	12	59.40
<i>Q/3h</i>	50	13.29	13.29	7.7	15.4	57.93
<i>Q/2h</i>	50	17	34	9.3	18.6	54.7
<i>Q/1h</i>	50	19	38	9.8	19.6	51.57

#### 5.1.4 Contenido de Cenizas

Los resultados obtenidos del porcentaje de cenizas para cada una de las muestras queda dentro del rango establecido según estudios previos, en los cuales se menciona que para tener quitosano de buena calidad, este debe tener menos del 1% de cenizas [138]. Al obtener el porcentaje de cenizas se obtiene la pureza de la muestra (indicador de ausencia de minerales) el cual es indicador de la efectividad del proceso de desmineralización. En lo que respecta a la solubilidad del Q y su viscosidad, esta se ve afectada por la presencia de residuos minerales remanentes presentes en las cenizas [138].

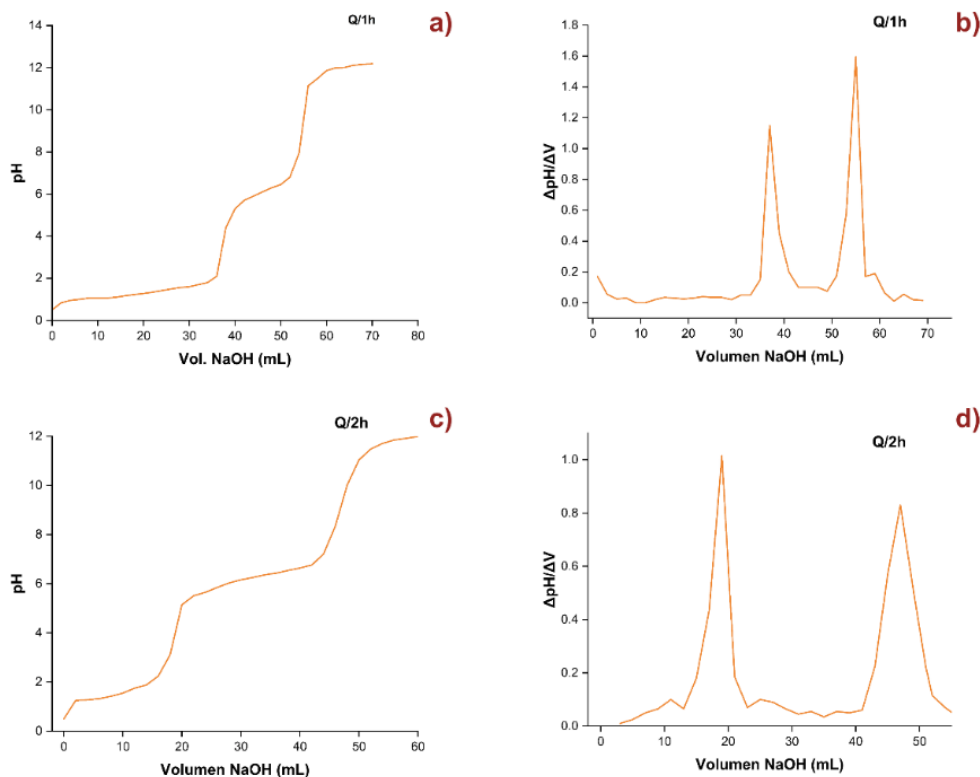
En la tabla 17 se muestran los resultados para cada una de las muestras de quitosano analizadas. Las cuales se analizaron por triplicado y se sacó un promedio general de cada una de ellas.

**Tabla 16:** Porcentaje de cenizas y pureza de quitosano extraído a diferentes tiempos de desacetilación.

Muestra	Cenizas (%)	Pureza (%)
<i>Q/4h</i>	0.5	99.50
<i>Q/3h</i>	0.32	99.68
<i>Q/2h</i>	0.22	99.78
<i>Q/1h</i>	0.29	99.71

### 5.1.5 Grado de Desacetilación (DDA)

Como se mencionó anteriormente el DDA del Q es un parámetro fundamental, donde las condiciones de extracción influyen directamente sobre las propiedades biológicas, fisicoquímicas y mecánicas [49]. Tras el análisis de DDA, se obtuvieron los resultados descritos en la tabla 18, teniendo como resultado valores de DDA mayores a 70%, donde la muestra Q/2h cuenta con un mayor grado de desacetilación. Los rangos óptimos de DDA van del 60-90%, dándole al quitosano propiedades de solubilidad con ácidos orgánicos diluidos, ya que el polímero cuenta con la presencia de unidades *N*-amino-*D*-glucosamina [139]. Este valor describe la relación entre los grupos amino y el grado de DDA que es directamente proporcional, por lo que podemos describir que a mayor concentración de grupos amino es mayor grado de desacetilación [140]. Las figuras 48 y 49 muestra cada una de las curvas de titulación obtenidas con sus respectivas derivadas, donde se obtuvieron los valores necesarios para el cálculo de DDA utilizando la ecuación correspondiente. En la tabla 18 se compilan los resultados obtenidos.



**Figura 48:** Curva de titulación y derivada para las muestras de Q/1h (a) y (b), Q/2h (c) y (d).

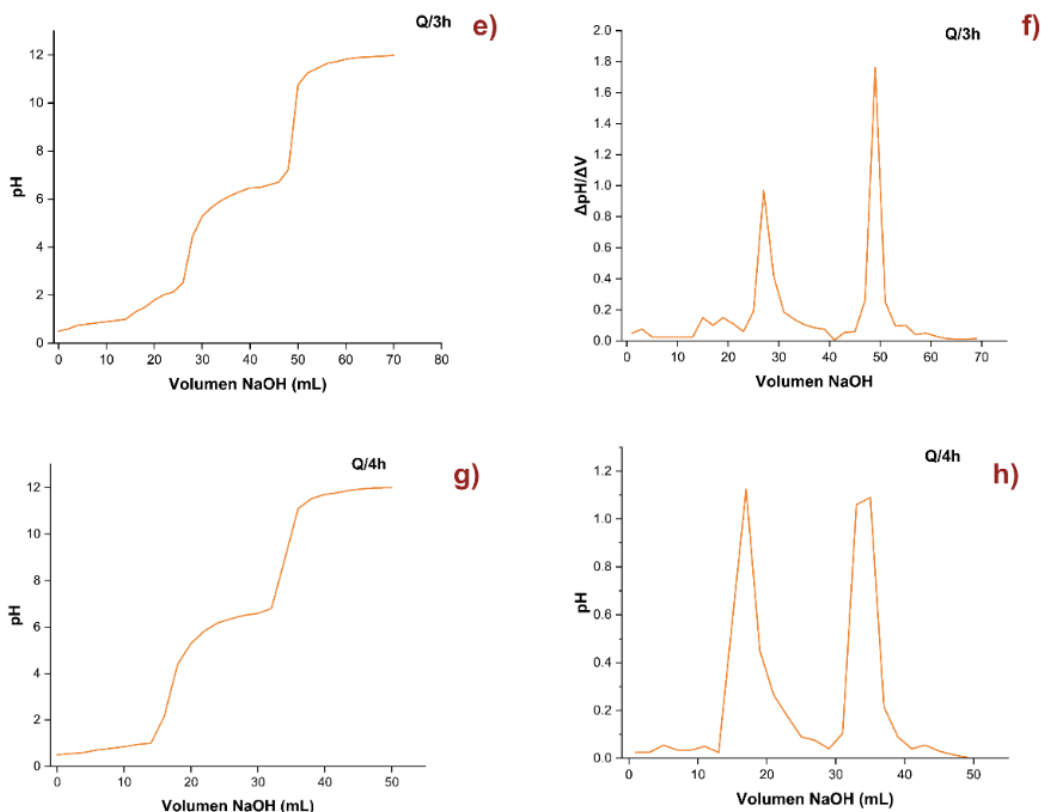


Figura 49: Curva de titulación y derivada para las muestras Q/3h (e) y (f), Q/4h (g) y (h).

Tabla 17: Resultados obtenidos por titulación para el cálculo del DDA.

Muestra de Quitosano	W (g)	Y (mL)	X (mL)	f (mol/L)	NH <sub>2</sub> (%)
Q/1h	0.5	55	37	0.1	57.96
Q/2h	0.5	47	21	0.1	83.72
Q/3h	0.5	49	27	0.1	70.84
Q/4h	0.5	35	17	0.1	57.96

### 5.1.6 Grado de *N*-acetilación

Tras el análisis en FTIR de cada una de las muestras, se obtuvieron resultados donde los rangos de porcentaje de *N*-Acetilación están dentro, a continuación, se muestra en la tabla 19 el valor del % de transmitancia perteneciente a las longitudes de onda 1320 y 1420 cm<sup>-1</sup> y el valor del grado de *N*-Acetilación.

**Tabla 18:** Porcentaje de transmitancia en función de la longitud de onda para la obtención del grado N-acetilación.

<b>Muestra</b>	<b>Longitud de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>%Transmitancia</b>	<b>Grado N-acetilación %</b>
<b>Q/1h</b>	1320	92.67	19.65
	1420	92.86	
<b>Q/2h</b>	1320	93.09	19.67
	1420	93.21	
<b>Q/3h</b>	1320	78.67	19.93
	1420	78.15	
<b>Q/4h</b>	1320	96.07	19.67
	1420	96.21	

### 5.1.7 Elección de muestra de quitosano

Se eligió la muestra de quitosano con 2 h de desacetilación (Q/2h), primeramente, por tener un peso molecular dentro del rango establecido en comparación a las otras muestras, y en segundo lugar un adecuado porcentaje de grupos amino (NH<sub>2</sub>). En lo que respecta al rendimiento contenido de cenizas y grado N-acetilación, los resultados entre todas las muestras fueron similares, sin embargo, estos dos parámetros donde hubo distinción son de suma importancia para la correcta elección de la muestra. En la tabla 20, se tienen los resultados obtenidos para la muestra Q/2h.

**Tabla 19:** Resultados para la muestra Q/2h

<b>Caracterización</b>	<b>Resultados</b>
<b>Peso Molecular</b>	1.26 x 10 <sup>5</sup>
<b>Rendimiento Total</b>	18.6% a partir de materia prima 54.7 % (a partir de quitina)
<b>Pureza</b>	99.78 %
<b>DDA (NH<sub>2</sub> %)</b>	83.72%
<b>Grado N-acetilación</b>	19.67%

### 5.1.8 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Algunos materiales poliméricos no muestran claramente su T<sub>g</sub>, como en este caso la quitina y Q. Esto puede estar relacionado al grado de entrecruzamiento, a la deficiente eliminación del agua y la técnica de preparación de la muestra, la sensibilidad del equipo y como la técnica de medición [141]. (figura 50 y 51).

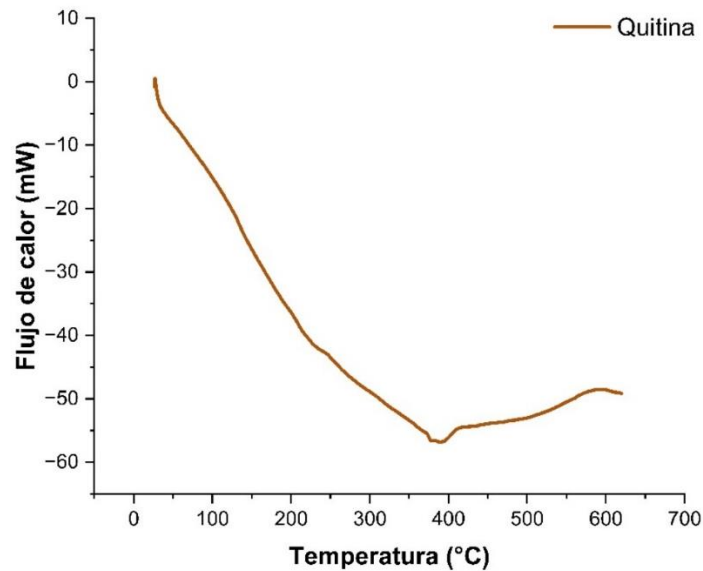


Figura 50 Curva DSC de Quitina

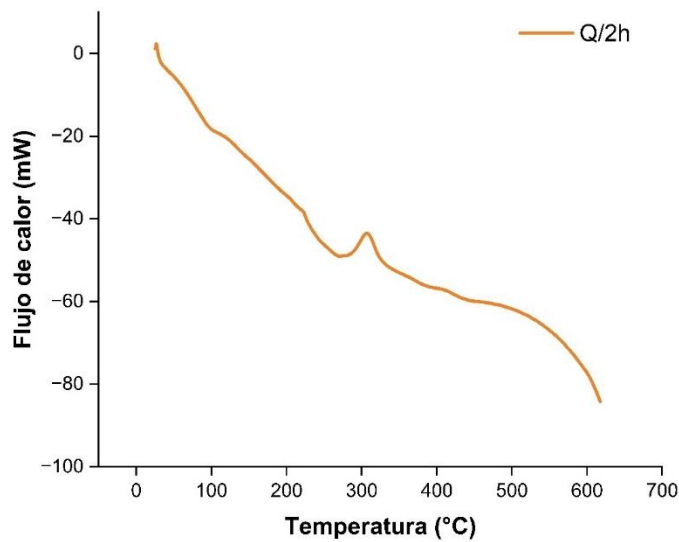


Figura 51: Curva DSC Quitosano.

### 5.1.9 Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 52 presenta el comportamiento de quitina y quitosano en un rango de temperaturas 0-700°C. La quitina (Figura 52) presenta 2 etapas marcadas de degradación, la primera se da a la pérdida de peso por la evaporación del agua y de los grupos hidrofóbicos presentes en las cadenas de la quitina, a una temperatura de 248°C con una pérdida de peso del 6%. La segunda etapa que es a los 385°C corresponde a la degradación de la estructura polimérica, en donde el anillo sacárido presenta deshidratación, así como un deterioro de las unidades acetiladas de la quitina <sup>[142]</sup>. En cuanto al quitosano en la Figura 54, se muestra dos fases de pérdida de peso, a 70°C comienza la primera degradación debido a la pérdida de humedad de agua presente en la muestra, la degradación de quitosano comienza a los 298°C con una pérdida de peso del 44%. Esto está relacionado con la despolimerización y descomposición de los grupos acetilo y amina del quitosano <sup>[143]</sup>. Finalmente se observa que se degrada por completo a los 425°C aproximadamente, teniendo un residuo de 33.22%.

Los de DTG (Figura 53) muestran para la quitina un pico endotérmico a los 47 °C, correspondiente a la pérdida de agua, y un pico de 298 °C correspondiente a los residuos de proteínas y pigmentos <sup>[144]</sup>. Finalmente, en 400.6 °C comienza la conversión de quitina acetilada a grupo amino del Q <sup>[144]</sup>. Los picos endotérmicos principales se muestran a diferentes temperaturas lo cual demuestra la cristalización de la quitina. De acuerdo a los enlaces de hidrógeno entre las fibras, la quitina tiene una buena estabilidad térmica debido a su estructura cristalina <sup>[145]</sup>. Por otro lado, el Q (Figura 53) muestra dos etapas de degradación, el primer pico endotérmico a 48 °C correspondiente a la pérdida de humedad y a la presión ejercida debido a la evaporación del agua <sup>[144]</sup>. Los polisacáridos como el quitosano en estado sólido tienen una estructura amorfa haciendo que tenga una fuerte afinidad al agua y facilidad a hidratarse <sup>[146]</sup>. El segundo pico endotérmico a 298 °C (Figura 53) corresponde a la degradación de los anillos sacáridos, de las estructuras de las cadenas y monómeros desacetilados (grupos amino)<sup>[132]</sup>.

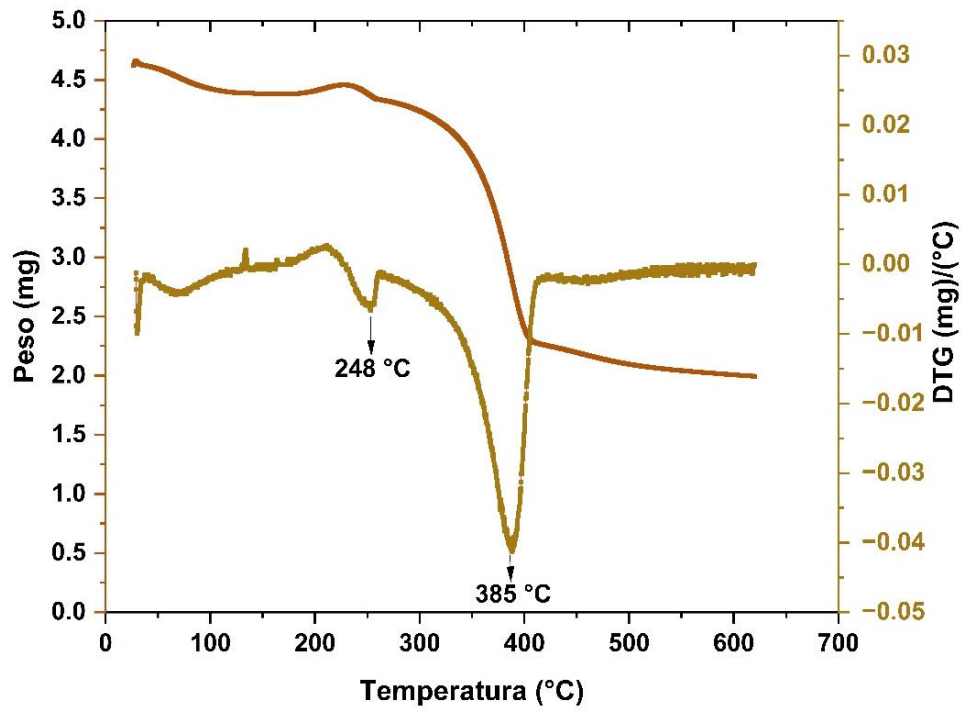


Figura 52: Curva tga y Dtg de Quitina

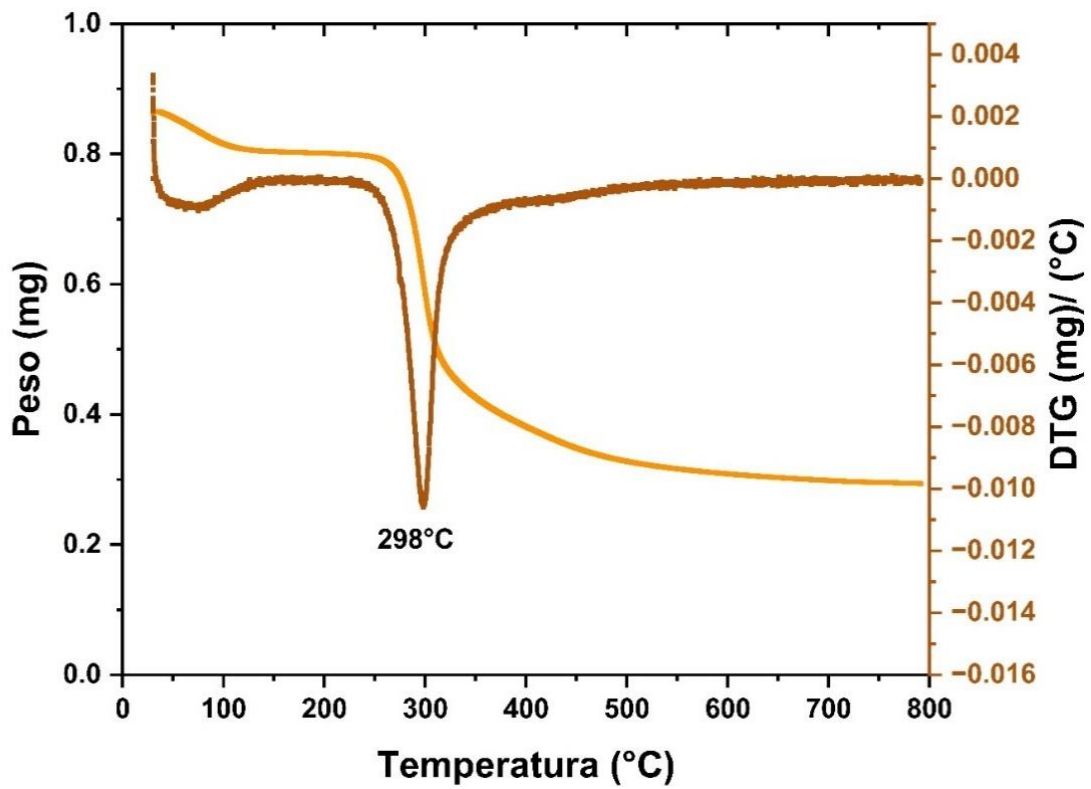


Figura 53: Curva Tga y Dtg de Q.

### 5.1.10 Análisis Morfológico y elemental

Por medio del SEM, son notorias las diferencias entre la quitina y el Q extraído. Se ha demostrado que la estructura de la superficie es una de sus propiedades más importantes, por que determinarán sus aplicaciones [42]. En la Figura 55, se puede observar que el Q presenta una estructura homogénea, suave y no fibrosa siendo este un indicador de una mejor estructura cristalina que la de la quitina (Figura 54), además de presentar grietas que son el resultado de la agitación a la cual se sometió la muestra en el proceso de desacetilación [136]. A su vez, se encontró que, el quitosano cuenta con poca porosidad y una superficie suave y lisa en algunos puntos, sugiriendo que los grupos *N*-acetil y los grupos amino forman conexiones débiles entre ellas, lo cual demuestra que el quitosano este desacetilado [143]. En la quitina se observa usualmente una morfología laminada, y homogénea reflejando que tiene una estructura poco cristalina, a diferencia del quitosano. En el Q se pueden ver algunas irregularidades en la estructura laminar, correspondiente a la cristalinidad, la cual puede ser causada por los enlaces de hidrogeno presentes [44]. Por ejemplo en el caso de la morfología de quitina y quitosano de la especie *Penaeus monodon* [147], *Parapenaeus longirostris* [148] y *Farfantepenaeus aztecus* [149], cuentan con estructura con cierta porosidad y microfibrillar, compacta y en capas. La aplicación del método de extracción química tiene influencia directa con el tipo de morfología que se obtendrá, existen 3 tipos de morfología para quitina y Q: la primera es aquella que tiene estructura microfibrilar y porosidad, la segunda la que no cuenta con porosidad ni estructura microfibrilar y por último la que solamente tiene estructura microfibrilar [150]. Por lo tanto, la quitina y Q extraído de *F. Californiensis* se agrupan en el tercer grupo, lo cual lo hace apto para aplicaciones antimicrobianas y para la generación de películas [134]. El-Araby et al. reporto que una superficie suave y lisa con poca porosidad se obtiene con el método químico, obteniendo quitosano apto para aplicaciones alimenticias [151].

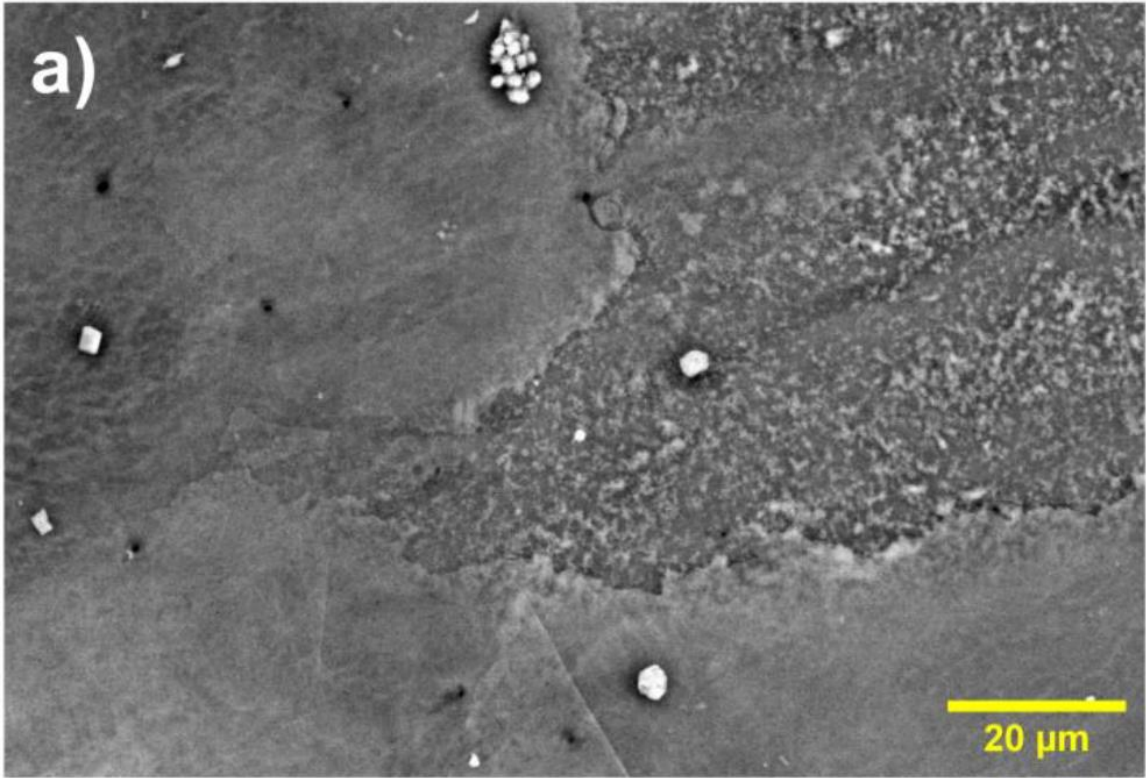


Figura 54: Micrografía SEM de quitina

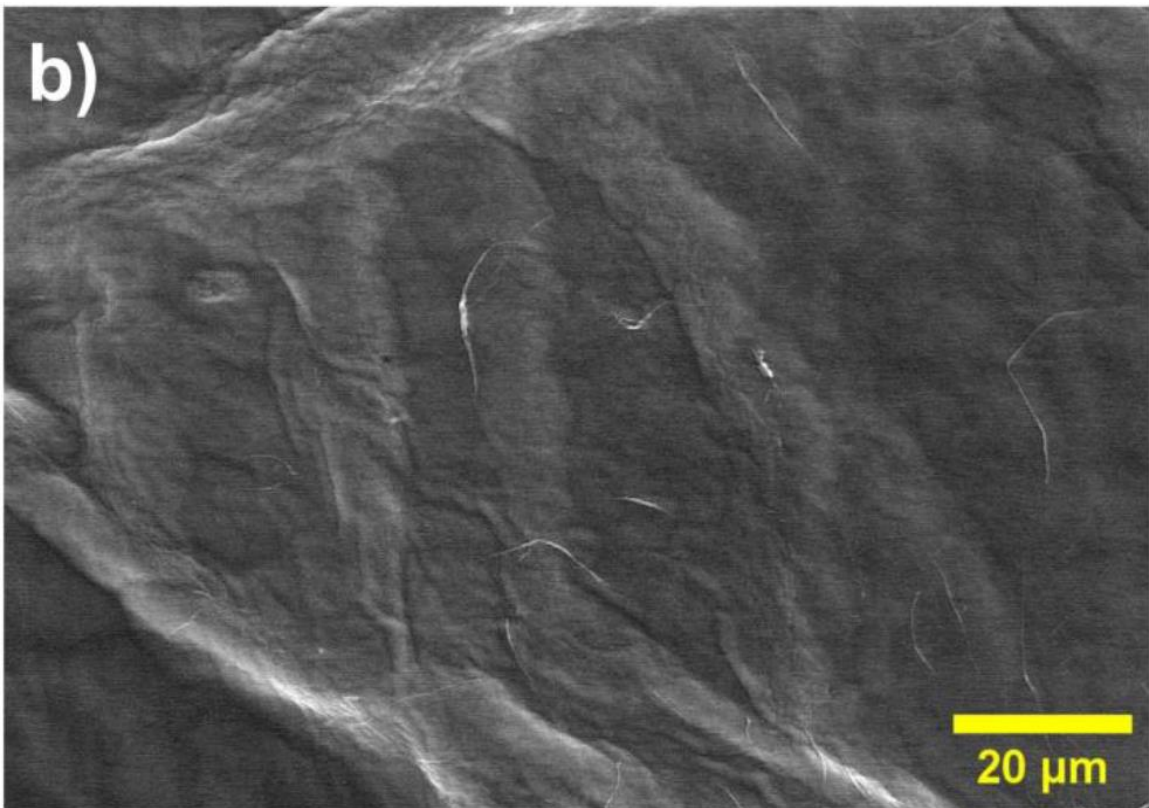


Figura 55: Micrografía SEM de quitosano.

## 5.2 Fase 2: Síntesis verde de SeNPs

Se realizó la síntesis verde de nanopartículas de selenio utilizando un extracto acuoso de las hojas de la planta *P. Sericea*, para ello se analizaron primeramente el extracto acuoso, y la solución coloidal de SeNPs.

### 5.2.1 Barrido fitoquímico de extracto acuoso de *P. Sericea*

El análisis fitoquímico cualitativo del extracto acuoso de las hojas de *P. Sericea* se muestra en la tabla 21. Se reveló la presencia de fitocompuestos con grupos funcionales fenoles (flavonoides, cumarinas y taninos). Estos grupos funcionales poseen la capacidad de fungir como reductores y estabilizantes naturales en NPs metálicas y no metálicas [19,152]. Se reportó que los extractos acuosos de *W. Somnifera*, y de semilla de fenogreco, utilizados para sintetizar SeNPs, se tuvo como resultado nanopartículas con morfologías esféricas y con tamaño menor a 200 nm, las cuales contienen fenoles, flavonoides, aminas, esteroides y alcaloides como fitocompuestos, fungiendo como reductores y estabilizantes [153].

**Tabla 20:** Fitocompuestos presentes en el extracto acuoso de *P. Sericea*.

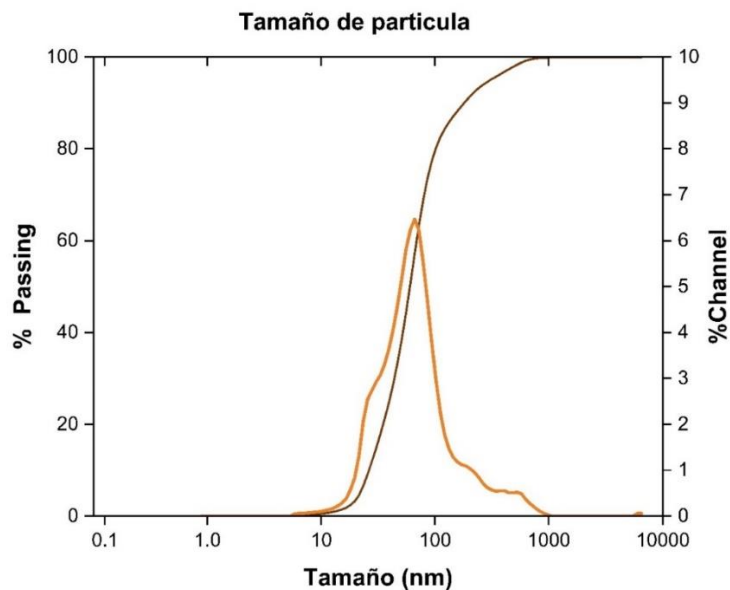
<b>Compuesto Fitoquímico</b>	<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>
<b>Almidón</b>	Lugol	-
<b>Gomas y mucilagos</b>	Etanol	-
<b>Ácidos Carboxílicos</b>	Bicarbonato de sodio	-
<b>Antraquinonas</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
<b>Alcaloides</b>	Hager	-
<b>Glucósidos</b>	Bortrager	-
<b>Fenoles</b>	FeCl <sub>3</sub>	+
<b>Flavonoides</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+
<b>Flobataninas</b>	HCl	-
<b>Saponinas</b>	Espuma	-
<b>Esteroides</b>	Salkoski	-
<b>Terpenoides</b>	Cloroformo, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
<b>Antocianinas</b>	HCl	-
<b>Cumarinas</b>	NaOH	+
<b>Taninos</b>	FeCl <sub>3</sub>	+

### 5.2.2 Caracterización SeNPs por dispersión de luz dinámica (DLS)

Los resultados obtenidos fueron en el potencial Z de -46.2 mV, y el tamaño de nanopartícula de 60.2 nm, en casi un 100% del total de la muestra. (Tabla 22 y figura 56). Esto sugiere una buena estabilidad de la solución coloidal de selenio, con aglomeración casi nula, ya que al tener valores mayores a 30 mV (positivo o negativo) es indicativo de que las NPs son estables en medios acuosos sin tener ningún tipo de aglomeración o floculación <sup>[154]</sup>. La carga negativa obtenida en el análisis se debe mayormente a que la síntesis fue realizada con extracto de la planta, al ser cubiertas y estabilizadas estas se recubren con capas biorgánicas compuestas por algunos fitocompuestos con proporciones de grupos carboxílicos ionizados, los cuales tienen cadenas de aminoácidos residuales y polisacáridos carboxilados que son responsables del valor negativo del potencial Z. Este valor negativo nos indicara el comportamiento e interacción que tendrán las nanopartículas de selenio con membranas de bacterias cargadas ya sea positiva o negativamente <sup>[94]</sup>. Estudios previos indican que se han obtenido tamaños de nanopartícula de 168.31 nm con extracto acuoso de *T. cordifolia* con un potencial Z de -23.9 mV <sup>[155]</sup>, NPs de un promedio de 4 a 16 nm, con potencial Z de -22.3 mV se obtuvieron en la síntesis con extracto acuoso de *Diospyros montana* <sup>[156]</sup> y al sintetizar con extracto de canela, se obtuvo un tamaño de nanopartícula promedio de 23.2 nm con un potencial Z de -28.6 mV <sup>[157]</sup>. Confirmando que tanto el tamaño promedio obtenido de nanopartículas y su estabilidad coloidal son resultados favorables.

**Tabla 21:** Tamaño de partícula, potencial Z y polaridad de SeNPs

Medición de datos	
Tamaño	60.2 nm
Potencial Zeta	46.2 mV
Polaridad	Negativa

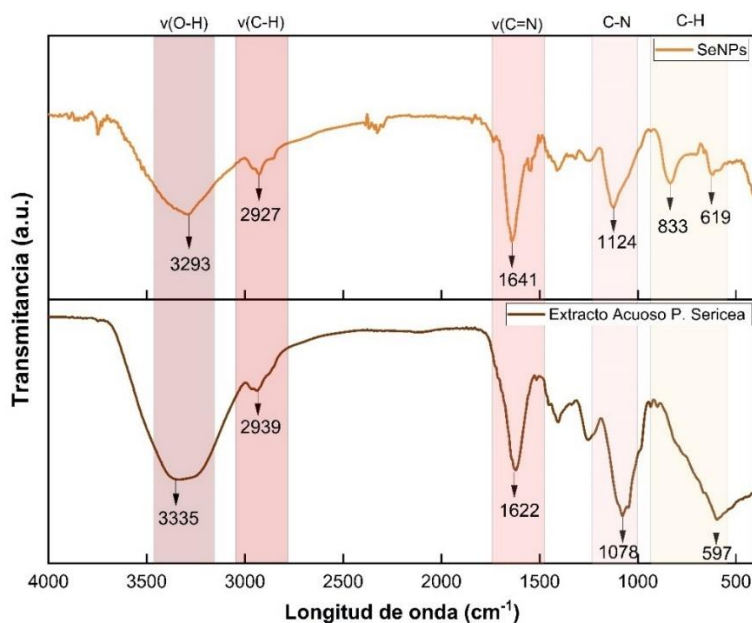


**Figura 56:** Distribución de tamaño de partícula SeNPs.

## 5.2.4 Espectroscopia FTIR

En la figura 57 se muestran los picos de transmitancia similares tanto en el extracto acuoso de *P. Sericea* y la solución coloidal de SeNPs sintetizadas, y se observa que en los picos ( $3335.61\text{ cm}^{-1}$  y  $3293.81\text{ cm}^{-1}$ ) corresponden a el radical hidroxilo -OH, el cual está presente en los fenoles, así como en los picos ( $2939.8\text{ cm}^{-1}$  y  $2930.88\text{ cm}^{-1}$ ) correspondientes a C-H de los alquinos, en los picos ( $1622.64\text{ cm}^{-1}$  y  $1626.79\text{ cm}^{-1}$ ) encontramos enlaces C=N de aminas aromáticas, en ( $1406.75\text{ cm}^{-1}$  y  $1411.87\text{ cm}^{-1}$ ) indica la presencia de compuestos aromáticos C-C. Se encontró un pico de  $1125\text{ cm}^{-1}$  en la solución de nanopartículas el cual corresponde a C-N de las aminas,  $832\text{ cm}^{-1}$  corresponde a haluros de alquilo y  $620\text{ cm}^{-1}$  a C-H enlace de alquinos. Los compuestos orgánicos fenólicos presentes en el extracto acuoso de *P. Sericea* funcionan como agentes estabilizantes en la reducción de selenio, según el análisis cualitativo realizado al extracto, estos compuestos son los flavonoides, cumarinas y taninos, formando una capa o recubrimiento alrededor de las nanopartículas. Sin embargo, para identificar específicamente a estas moléculas se necesita una mejor validación <sup>[153]</sup>. Por lo tanto, se

comparó con otros estudios donde se encontró que en el extracto de *Artemisia dracuncululus* el pico de los flavonoides ( $1430\text{ cm}^{-1}$ ) actúa en la reducción y en la estabilización de SeNPs [158]. También, con el uso de extracto de la flor *Bombax ceiba* está presente el de -OH a  $3416\text{ cm}^{-1}$  el cual corresponde a los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos [159] y finalmente se encontraron en los extractos de hojas de *Amphipterygium glaucum* ( $3245\text{ cm}^{-1}$ ) y de flores de *Calendula officinalis* ( $3278\text{ cm}^{-1}$ ) utilizados para la síntesis de SeNPs [160].



**Figura 57:** Espectros FTIR comparativos de extracto acuoso *P. Sericea* y SeNPs

### 5.2.5 Espectroscopia UV-Vis

Visualmente podemos corroborar la formación de SeNPs con el cambio de color de la solución, de transparente a rojizo/naranja, sin embargo, es de suma importancia comprobar la reducción de sal de selenio a  $\text{Se}^0$ , lo cual se monitorea con la longitud de onda y el espectro de absorción en dicha solución, bajo el rango de longitud de onda de 200-700 nm [19]. Así como su plasmón de resonancia, el cual es el causante de cambio de color de la solución coloidal [90]. De acuerdo a esta medición, se observó un pico

característico de absorción de 261.33 nm (Figura 58), confirmando la presencia de selenio en la solución coloidal. El espectro de absorción varía con el tamaño de partícula, por ejemplo, en partículas más pequeñas se absorben mayores longitudes de onda, gracias al efecto de confinamiento cuántico, el cual es dependiente al bandgap de energía que tienen las SeNPs [161]. Para la muestra se entiende que contiene tamaños de SeNPs pequeñas, ya que entre menos valor tenga el pico de absorción nos indica menor tamaño de nanopartícula [162]. También, se deduce que la morfología de las nanopartículas es en forma de esferas [163], lo cual se confirmara con un análisis de SEM. El pico de absorción del espectro se refleja ya que la excitación de los plasmones localizados en la superficie causa una dispersión de luz fuerte por un campo eléctrico en la longitud de onda donde ocurre la resonancia. También, indica la composición del medio que los contiene y la interacción entre los fitocompuestos que actúan como ligandos, cubrientes y estabilizantes. Se observan pequeños picos los cuales podrían deberse a las moléculas orgánicas presentes del extracto añadido para la síntesis de SeNPs [164]. Como ejemplos comparativos de estudios previos, se tiene que al utilizar extracto acuoso de hojas de *Diospyros montana*, se obtuvo de resultado una banda de absorción de 261 nm [165], con extracto de *Olea ferrugínea* el pico característico obtenido fue de 258 nm [90] y finalmente con SeNPs sintetizadas con extracto de *Ceropegia bulbosa Roxb* se obtuvo un pico de 277.5 nm [166]. Para la síntesis de SeNPs con un pico de absorción de 270 nm tienen buena inhibición ante *S. aureus* [167].

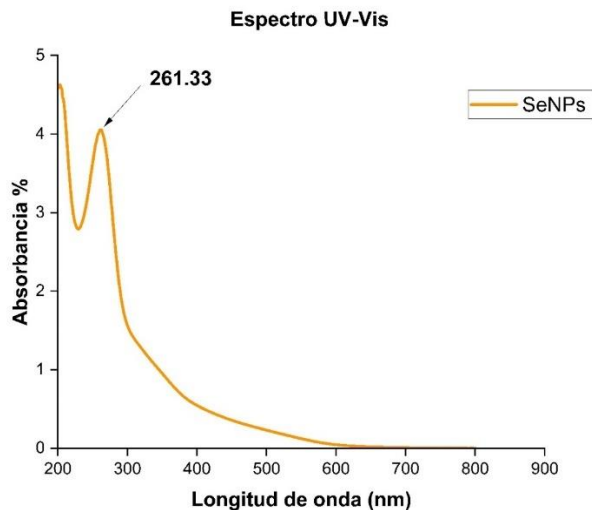
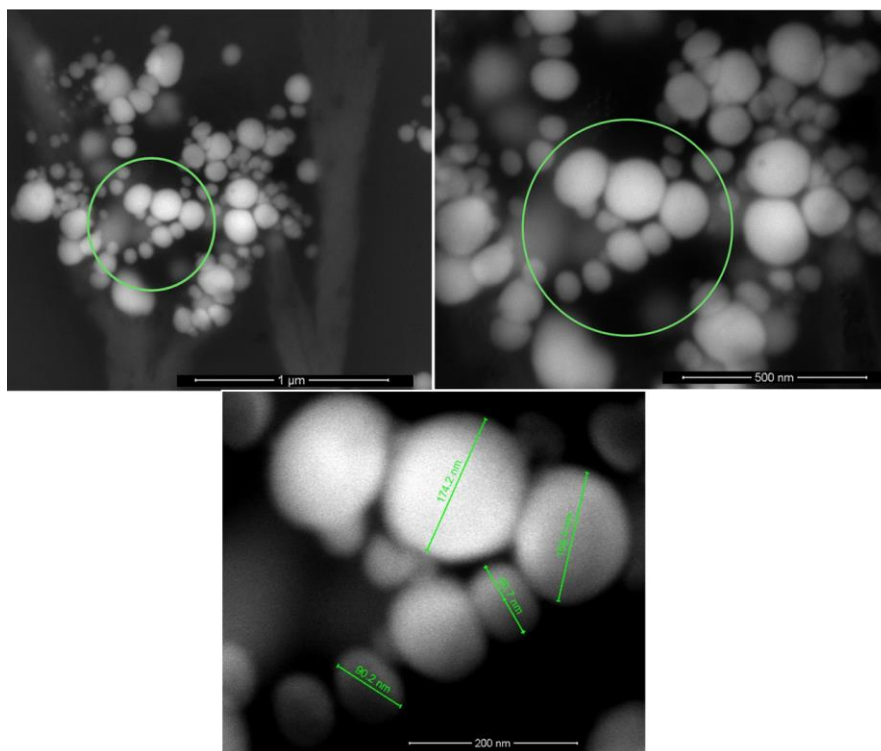


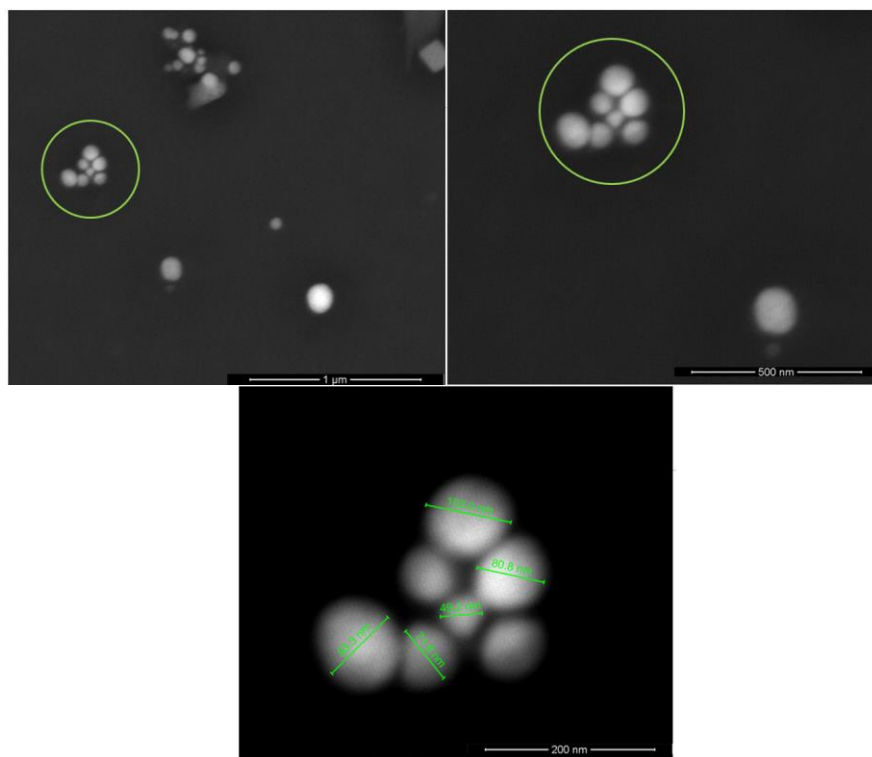
Figura 58 Espectro UV-Vis de SeNPs.

## 5.2.6 SEM

Para conocer la morfología, el tamaño y distribución de las SeNPs se realizó el análisis de SEM, mostrado en la Figura 59 y 60. Se observa que las NPs tienen tamaños menores a 150 nm y morfología esférica con una distribución estable. Se ha demostrado que el tamaño y forma de las nanopartículas tiene influencia directa con su actividad antimicrobiana <sup>[96]</sup>. Bongekile et al. realizó la síntesis de SeNPs con extracto etanolico de *Moringa Oleifera* por método solvotermal, obteniendo nanopartículas con morfología poligonal, de tamaño  $82.86 \pm 19.42$  nm, tuvieron buena actividad inhibitoria contra la bacteria *E. Coli* (10.1 mm) <sup>[19]</sup>. En el caso de NPs con forma esférica, se ha obtenido una mejor actividad antibacteriana, por ejemplo, en el caso de SeNPs sintetizadas con extracto acuoso de hojas de *Psidium Guajava*, las cuales tienen forma esférica y un tamaño promedio de 70.93 nm, teniendo halos de inhibición de 14 mm en promedio contra la bacteria *E. Coli* <sup>[168]</sup>. Existe cierta aglomeración entre las SeNPs, debido a la alta energía de superficie y sus propiedades electroquímicas <sup>[169]</sup>. Es común este comportamiento de aglomeración en síntesis con extractos de plantas, ya que los grupos funcionales presentes en las biomoléculas de los fitocompuestos recubren y estabilizan a las NPs, y posteriormente se comienza la nucleación de iones de Selenio. Esto beneficia en cuanto aplicaciones biológicas, ya que se ha reportado que cuando se tiene aglomeración de nanopartículas se tiene actividad biológica alta <sup>[170]</sup>.



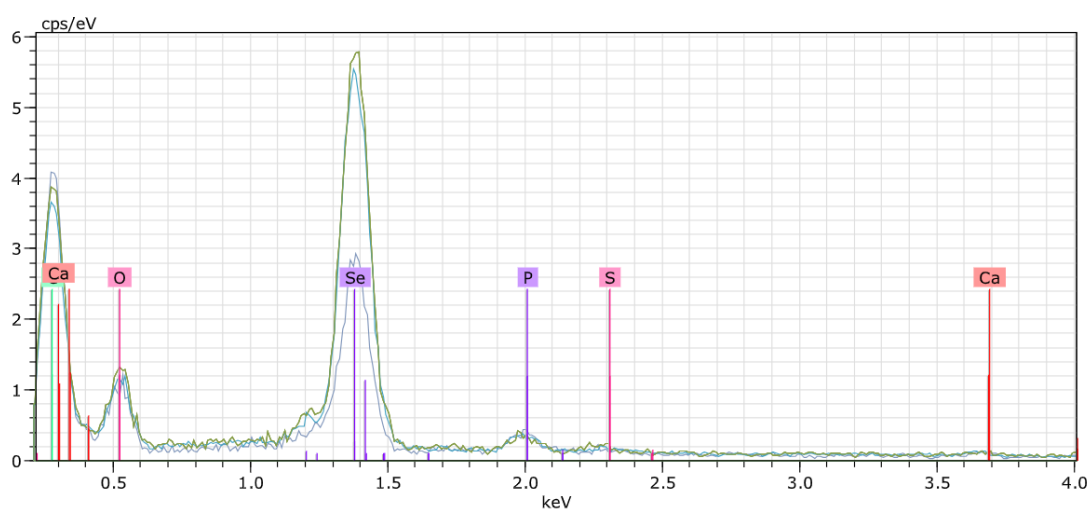
**Figura 59** Análisis SEM de SeNPs.



**Figura 60:** Análisis SEM 2 de SeNPs.

### 5.2.3 EDS

Para tener un análisis elemental y detallado de la solución coloidal, se obtuvo el espectro EDS de la muestra obteniendo el pico de absorción distintivo de las SeNPs (figura 61), como elementos complementarios se encontró C, O, Si, P y S. El análisis elemental indica Se 36.59%, y 43.20% de C, ya que existen compuestos orgánicos (fenoles) en el extracto acuoso de la planta utilizado para la reducción de la sal de selenio (tabla 23). Las SeNPs muestra un pico de absorción en 1.38 KeV, el cual corresponde a Selenio L $\alpha$  [171]



**Figura 61:** Espectro EDS de SeNPs

**Tabla 22:** Porcentaje en masa de elementos presentes en SeNPs

Porcentaje en masa	
Elemento	%
C	51.28
Se	29.47
O	14.90
P	1.54
S	0.45

## 5.2.7 AFM

Para el análisis de la topografía de superficie y morfología de la muestra, se utilizó la técnica de AFM, ya que esta brinda información cuantitativa sobre el largo, alto, ancho y textura de la superficie que contiene la solución coloidal de SeNPs, es una técnica rápida e importante para el análisis de soluciones acuosas de nanopartículas que se realiza previamente al análisis de SEM, para conocer el tamaño y forma de nanopartícula. La figura 62 muestra el histograma de altura, y en la figura, se representa la perspectiva 3D donde se observa el tamaño, distribución de altura y la morfología de las SeNPs depositadas en la superficie del sustrato de vidrio (Figura 63), los resultados de AFM muestran que estas, tienen una forma esférica con un diámetro aproximado de 100 nm, lo cual es similar al resultado obtenido con la técnica DLS <sup>[171]</sup>.

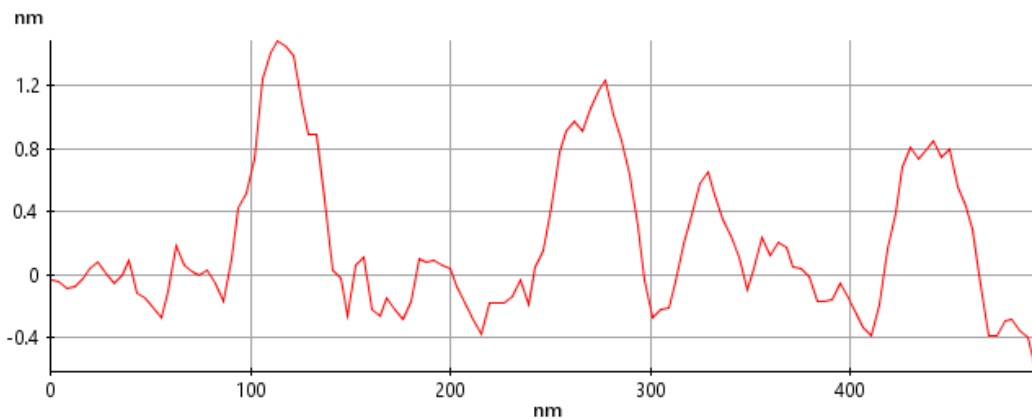


Figura 62 Histograma de alturas de SeNPs

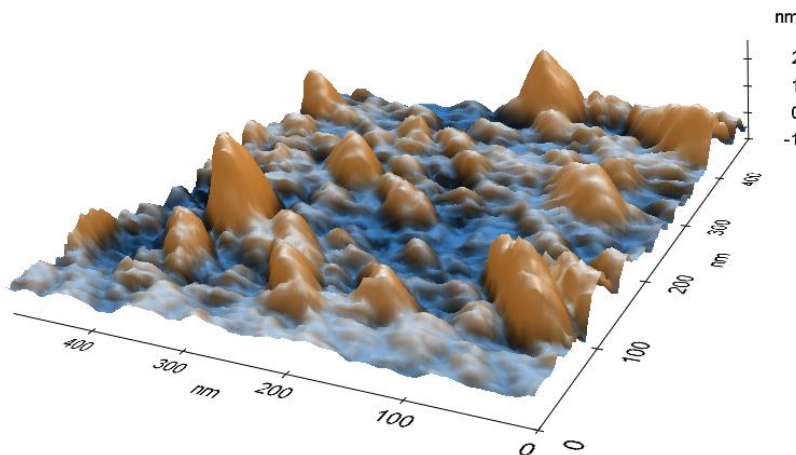


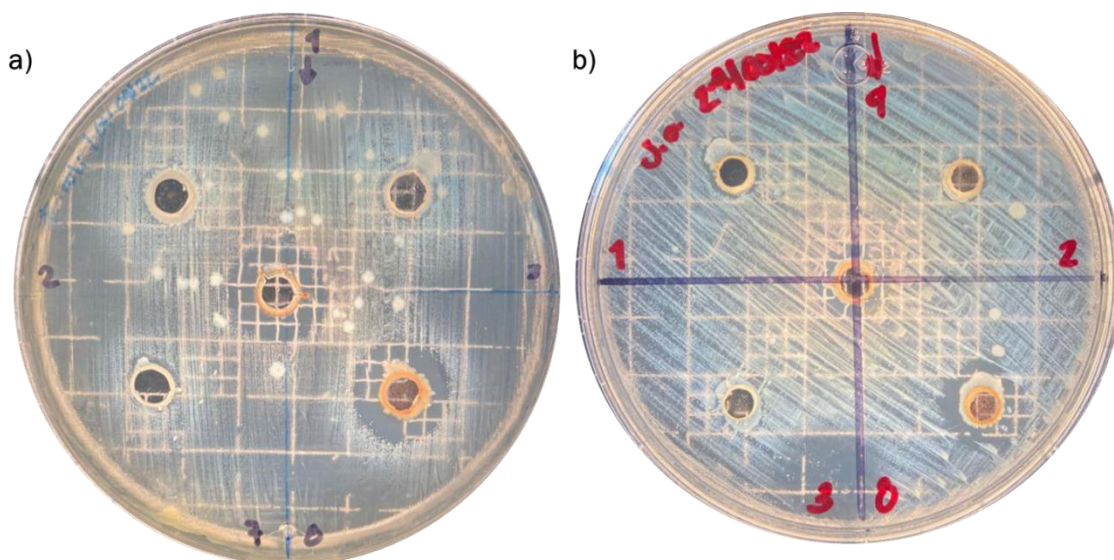
Figura 63: Perspectiva 3D de SeNPs por AFM.

### 5.2.8 Pruebas antimicrobianas (Difusión en agar)

Las SeNPs tuvieron una actividad antimicrobiana considerable ante patógenos bacterianos comúnmente encontrados en los alimentos, como lo es *E. coli* y *S. aureus*, la zona de inhibición representa la región en la cual la bacteria no fue capaz de esparcirse, por lo tanto, los resultados obtenidos nos dicen que el mayor halo de inhibición fue ante la bacteria Gram negativa *E. coli* (17.5 mm) mientras que para la bacteria Gram positiva *S. aureus* se presentó un halo de inhibición de 11.4 mm. Esto nos dice que las SeNPs sirven como agente antibacteriana. (Figura 64 y 65), teniendo mayor eficiencia con bacterias Gram negativas. Las SeNPs inhiben el crecimiento bacteriano causando una disrupción en la membrana celular <sup>[172]</sup>.

En general, las propiedades antibacterianas de las SeNPs se deben a la disfunción metabólica debido a la disminución de concentraciones de ATP (Adenosin trifosfato), aumento de la concentración intracelular de ROS, causando estrés oxidativo, que resulta en una pérdida de resistencia bacteriana a las SeNPs, y la inhibición de la proteína síntesis y mutación y daño del ADN, así como la despolarización y destrucción de la membrana bacteriana causando apoptosis <sup>[173]</sup>. (Figura 66)

Por lo que las SeNPs tienen una actividad antibacterial óptima para aplicaciones en alimentos.



**Figura 64:** Halos de inhibición en análisis antibacteriano a) *E. coli* y b) *S. aureus*.

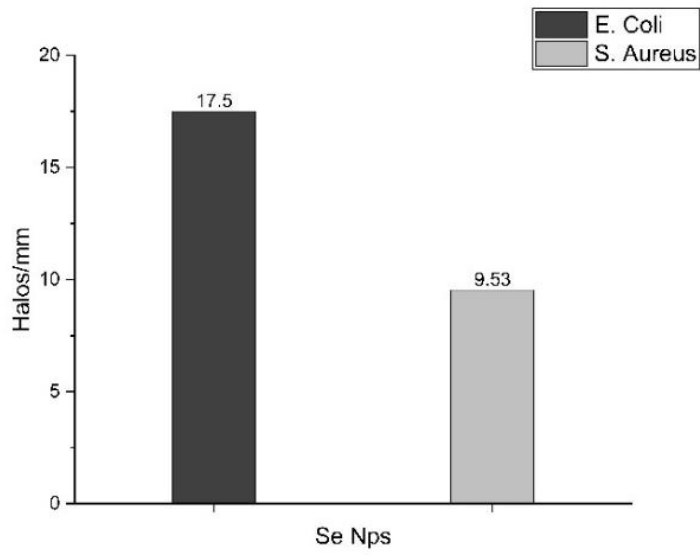


Figura 65: Resultados actividad antimicrobiana

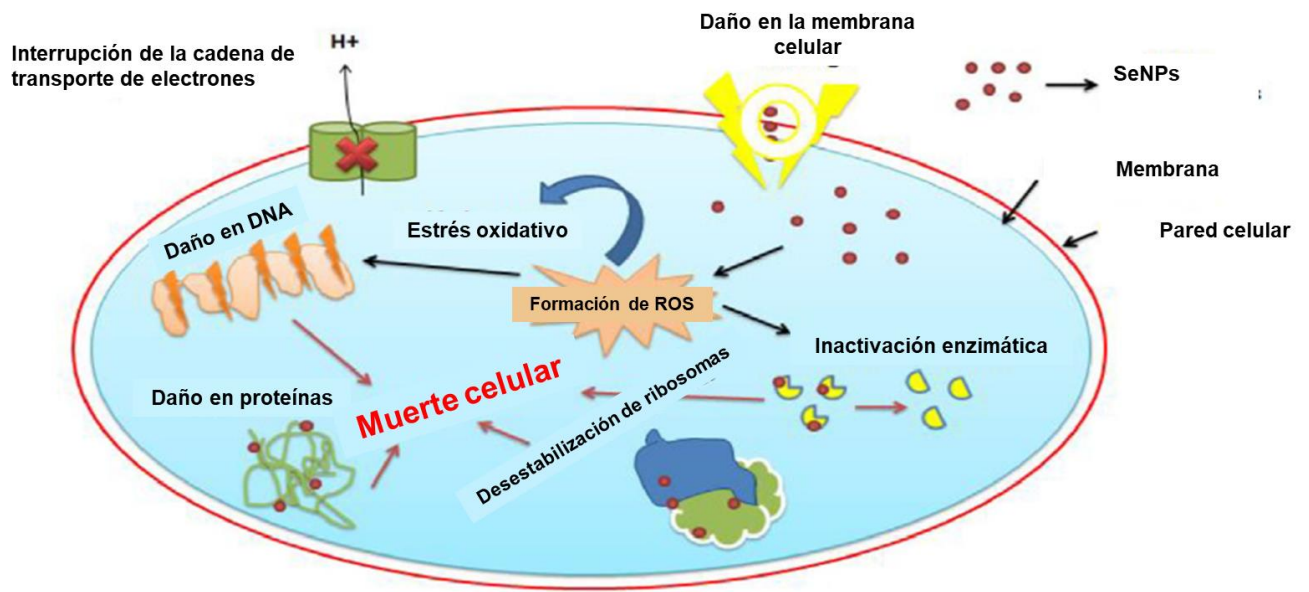


Figura 66: Mecanismo antibacteriano de SeNPs en bacterias [96].

### 5.3 FASE 3: Elaboración de películas plásticas a base de biopolímeros

#### 5.3.1 Apariencia, espesor y densidad aparente

La apariencia es una característica que los consumidores verán de primera mano, por lo que a simple vista se evaluó la transparencia de las películas plásticas. Las muestras Q y Q/Se tienen un color ligeramente amarillento y una buena transparencia, debido al color que tiene la solución de quitosano pura. En cuanto a las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se son totalmente transparentes. Esta transparencia visual refleja la buena miscibilidad de los componentes de la mezcla de biopolímeros. En caso que estos componentes no hubieran sido compatibles y no se hubiera formado la correcta reticulación de Q y PVA, las películas tendrían alta opacidad, debido a la reflexión o dispersión de la luz en la interfaz de fase haría que se tuviera una transparencia baja. La figura 67 muestra a cada una de las películas plásticas demostrando transparencia [49].



**Figura 67:** Transparencia visual de las películas plásticas.

En la tabla 24 se presentan los espesores promedio obtenidos en las películas plásticas y su densidad aparente. La homogeneidad entre el espesor de cada una de las muestras, indica una buena distribución de la mezcla y buena miscibilidad y compatibilidad entre los componentes de la mezcla polimérica <sup>[115]</sup>, así como una buena distribución a lo largo del molde y una cantidad óptima para para su correcta síntesis.

En cuanto a la densidad aparente de cada muestra existe una variación entre las muestras Q y Q/PVA, teniendo una mayor densidad aparente que las muestras Q/Se y Q/PVA/Se, debido a la presencia de SeNPs, ya que vuelve más porosas a las películas plásticas <sup>[49,115]</sup>, lo cual podría deberse a que las nanopartículas irrumpen en la cadena polimérica tanto del quitosano como del PVA, rompiendo algunos enlaces y disminuyendo la cohesión, lo que causa aumento en su permeabilidad, que es la facilidad de transmisión de cualquier fluido como agua, vapor y oxígeno a través del material. La densidad aparente está muy relacionada con la permeabilidad, el espesor y la porosidad del material y con su actividad antimicrobiana, por lo que las películas plásticas con mayor densidad aparente tienen una mayor actividad microbiana aumentando el efecto de barrera de oxígeno y una reducción de transferencia de humedad por su poca porosidad. Esta propiedad también facilita la migración de los compuestos químicos como el grupo amino para romper la pared celular de las bacterias <sup>[115]</sup>.

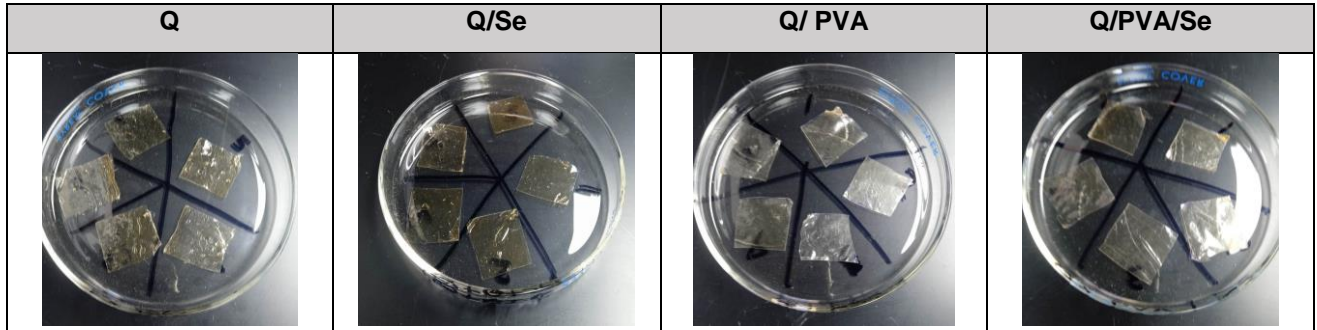
**Tabla 23** Espesor promedio y densidad aparente de las películas plásticas.

Muestra	Espesor (mm)	Densidad Aparente g/cm <sup>2</sup>
<b>Q</b>	0.2	1.33
<b>Q/Se</b>	0.2	0.7
<b>Q/PVA</b>	0.2	1.36
<b>Q/PVA/Se</b>	0.2	0.764

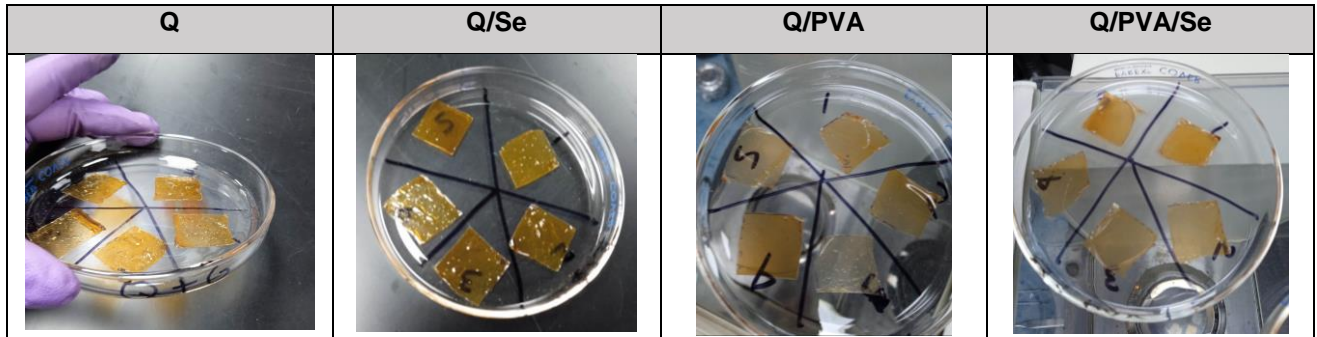
### 5.3.2 Porcentaje de contenido de humedad (MC%), grado de hinchabilidad (SP%) y solubilidad (S%)

En la figura 68 se tiene cada una de las variables utilizadas para el estudio de estas propiedades de comportamiento frente al agua.

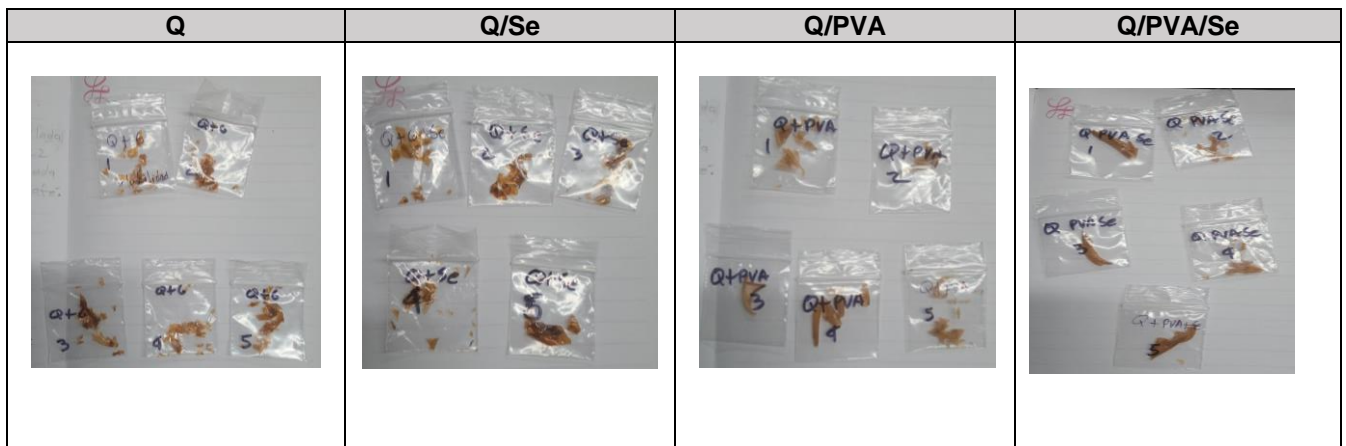
W<sub>0</sub>:



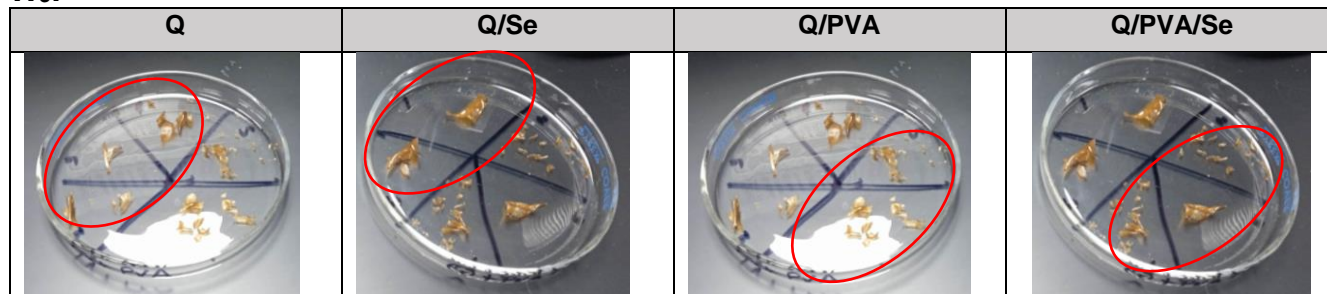
W<sub>1</sub>:



W<sub>2</sub>:



W<sub>3</sub>:

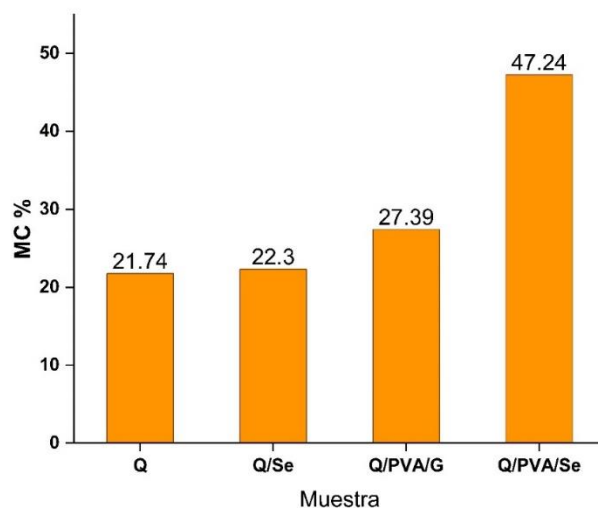


**Figura 68** Resultados pruebas MC%, SP% y S%.

Las muestras Q y Q/Se, mostraron un porcentaje de contenido de humedad del 21.74% y 22.3%. Este resultado se debe a que el tiempo y la temperatura de secado son factores que afectan inversamente al contenido de humedad de las películas plásticas. Cuando se emplea un tiempo de secado largo a temperaturas menores a 40 °C la estructura de la solución polimérica se reorganiza por la interacción entre los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals de las moléculas de agua, así como por el comportamiento hidrofílico del Q. De este modo, la solución adquiere una estructura gelatinosa que, posteriormente, se convierte en película. Por el contrario, cuando se utiliza un tiempo reducido de secado a temperaturas mayores, como ocurrió en este caso (70 °C), la etapa de formación de gel se acorta y la solución inmediatamente se convierte en película, debido a la evaporación acelerada del agua. Como consecuencia, se obtiene una estructura desordenada del biopolímero y un porcentaje de humedad bajo <sup>[125]</sup>.

Las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se obtuvieron 27.39% y 47.24% respectivamente. El PVA presente en las películas plásticas ocasiona un aumento de porcentaje de humedad debido a los puentes de hidrogeno entre el quitosano y PVA existentes en la reticulación de estos dos polímeros <sup>[174]</sup>

En las películas plásticas con SeNPs se ve un aumento del contenido de humedad debido a que estas interactúan aumentando las interacciones moleculares entre el quitosano y PVA <sup>[175]</sup>. La figura 69 muestra los resultados para cada una de las películas plásticas.

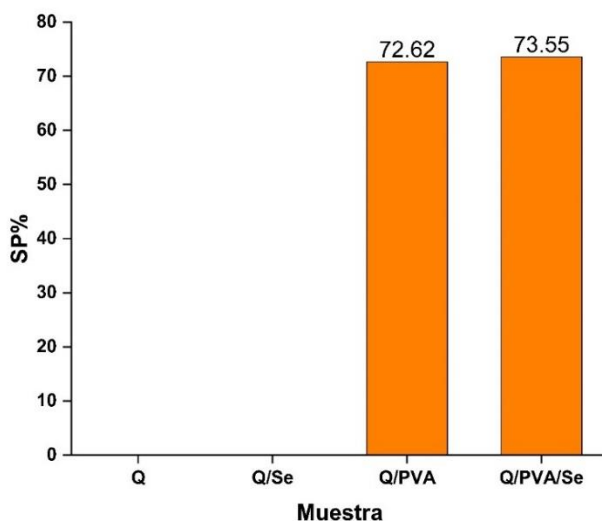


**Figura 69** Grafica comparativa de MC% de cada una de las películas plásticas.

El porcentaje de hinchabilidad (SP%) para las muestras Q y Q/Se obtenido fue nulo, lo que indica que las películas tuvieron una absorción completa de agua y, por ende, una nula capacidad de retención de agua en la matriz, disolviendo las películas por completo. Este comportamiento puede explicarse por la capacidad hidrofílica que tiene el Q y la cantidad de glicerol agregado en la preparación de la película [176]. Ya que el glicerol utilizado como plastificante tiene una naturaleza hidrofílica debido a la presencia de grupos carboxilo e hidroxilo, por lo que su escasez en la matriz del material redujo la interacción con las moléculas de agua [125].

Las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se tienen un porcentaje de entre 72.62% y 73.55% de hinchabilidad respectivamente (figura 70), ya que la presencia de PVA aumenta la capacidad de interacción con el agua, por los grupos hidroxilo los cuales son hidrofílicos, pero esta agua absorbida se retiene en el material a diferencia de las muestras de quitosano, ya que las cadenas intermoleculares entre Q y PVA toman lugar, favoreciendo la hinchabilidad [177]. La hinchabilidad es directamente proporcional a la cantidad de PVA que está en el material, ya que el movimiento de las moléculas de PVA se dificulta por el efecto de reticulación con el quitosano, debido a los enlaces de hidrogeno [178]. Por lo tanto la reticulación entre estos dos polímeros influye en esta propiedad debido a

formación de una red rígida entre las cadenas intermoleculares de ambos polímeros teniendo un balance entre el grupo amino del quitosano y el grupo hidroxilo del PVA [178]. En cuanto a la presencia de SeNPs en la muestra Q/PVA/Se se detectó un ligero aumento en la hinchabilidad gracias a la sobresaturación de moléculas en la cadena polimérica por parte de las nanopartículas, de igual forma los fitocompuestos presentes como estabilizantes en las SeNPs gracias a la síntesis verde podrían estar interfiriendo por contener fenoles y flavonoides [7].



**Figura 70:** Grado de hinchabilidad de las películas plásticas.

La solubilidad (S%) para las películas plásticas Q y Q/Se es del 64.63% y del 65.04% respectivamente, la cual puede atribuirse a los grupos hidroxilo presentes en el glicerol añadido. Estos grupos se insertan en la cadena polimérica del material y promueven la migración de moléculas de agua, lo que facilita las interacciones entre los componentes de la muestra. Como resultado, se reduce el hinchamiento del material y se favorece la disolución [179]. También, la solubilidad es mayor porque el quitosano es hidrofílico y absorbe en su totalidad el agua, hasta disolverse.

En cuanto a las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se cuenta con el 40.28% y 41.36% respectivamente (figura 71), al tener interacción entre el grupo amino del quitosano y el grupo amino del PVA en el proceso de reticulación por los puentes de hidrogeno, se

forman cadenas rígidas entre los dos polímeros lo cual reduce drásticamente la solubilidad del material [174]

Debido a la presencia de SeNPs en Q/Se y Q/PVA/Se, estas se vuelven más densas porque tienen interacción con la cadena polimérica de la reticulación entre Q y PVA, teniendo mayor resistencia al agua, por lo que esto es directamente proporcional a la cantidad agregada de solución de SeNPs en las películas plásticas [175].

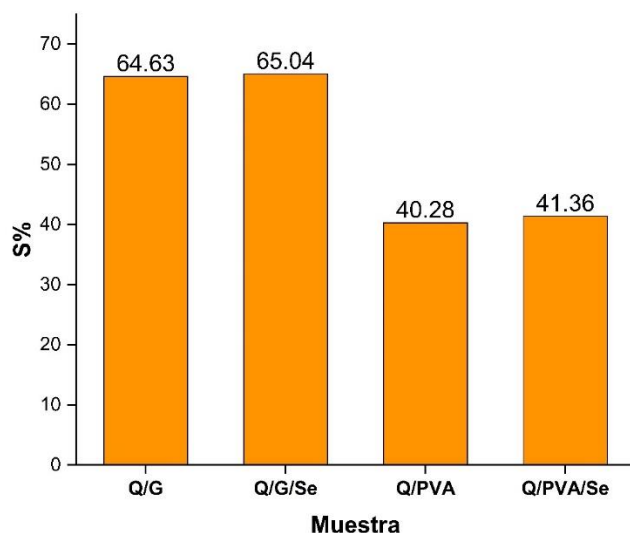


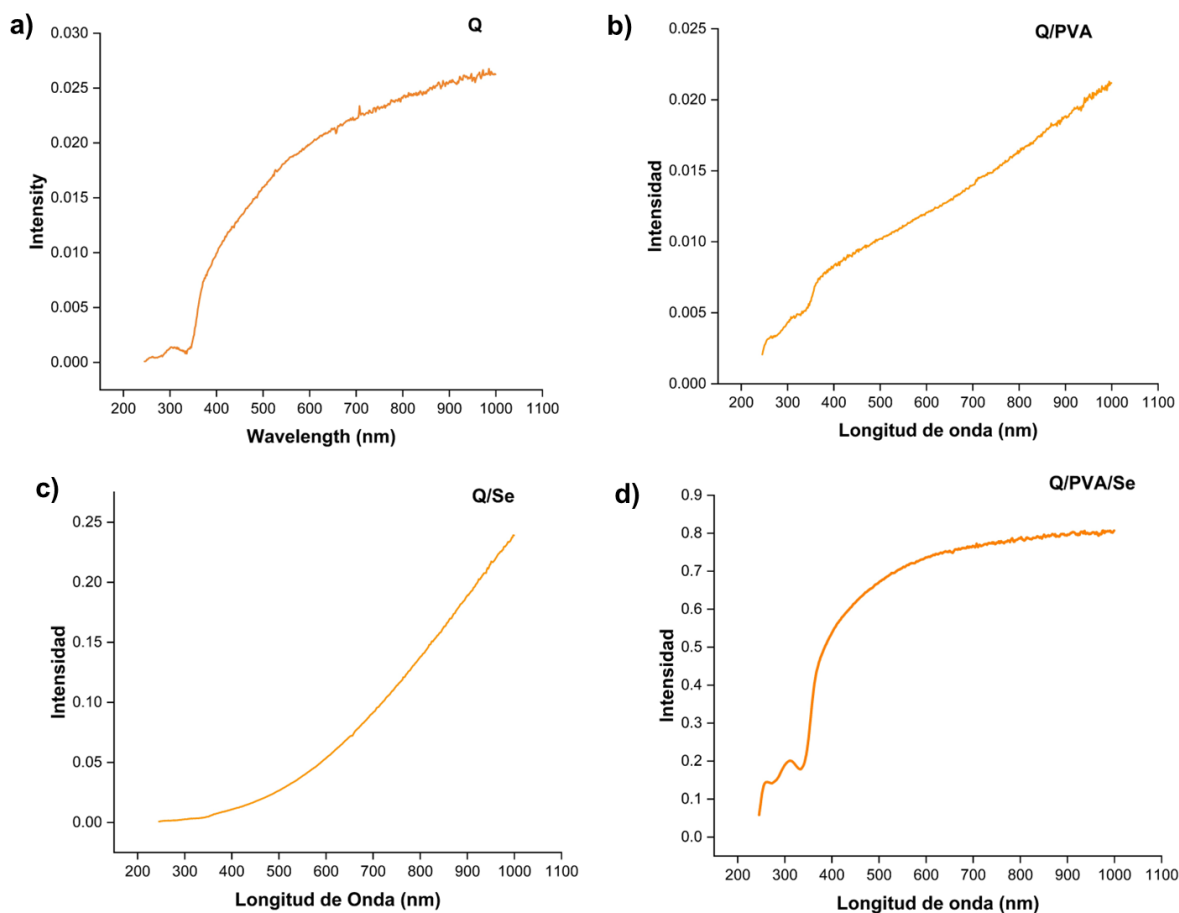
Figura 71 Solubilidad de las películas plásticas.

### 5.3.3 Transparencia/opacidad

La opacidad y transparencia de las películas plásticas se muestra en la tabla 25. El mayor valor de opacidad lo obtuvo la muestra Q/PVA/Se con 0.365 mm y el menor fue la muestra Q/PVA con 0.06 mm. Lo que indica que la adición de PVA tiene influencia directa con las propiedades ópticas de los materiales, sin embargo, este valor no tiene mucha variación comparada con las muestras Q y Q/Se. Entre menor sea el valor de la opacidad, es mayor la cantidad de luz que pasa a través del material, por lo que este valor es inversamente proporcional a la transparencia. Confirmando que todas las muestras tienen una alta transparencia tal y como se observa en la apariencia visual. Ver figura 72.

**Tabla 24:** Propiedades ópticas de las películas plásticas.

Muestra	Opacidad	Transparencia
Q	0.23	99.77
Q/Se	0.26	99.73
Q/PVA	0.06	99.94
Q/PVA/Se	0.365	99.63



**Figura 72:** Curvas de intensidad UV de las películas plásticas.

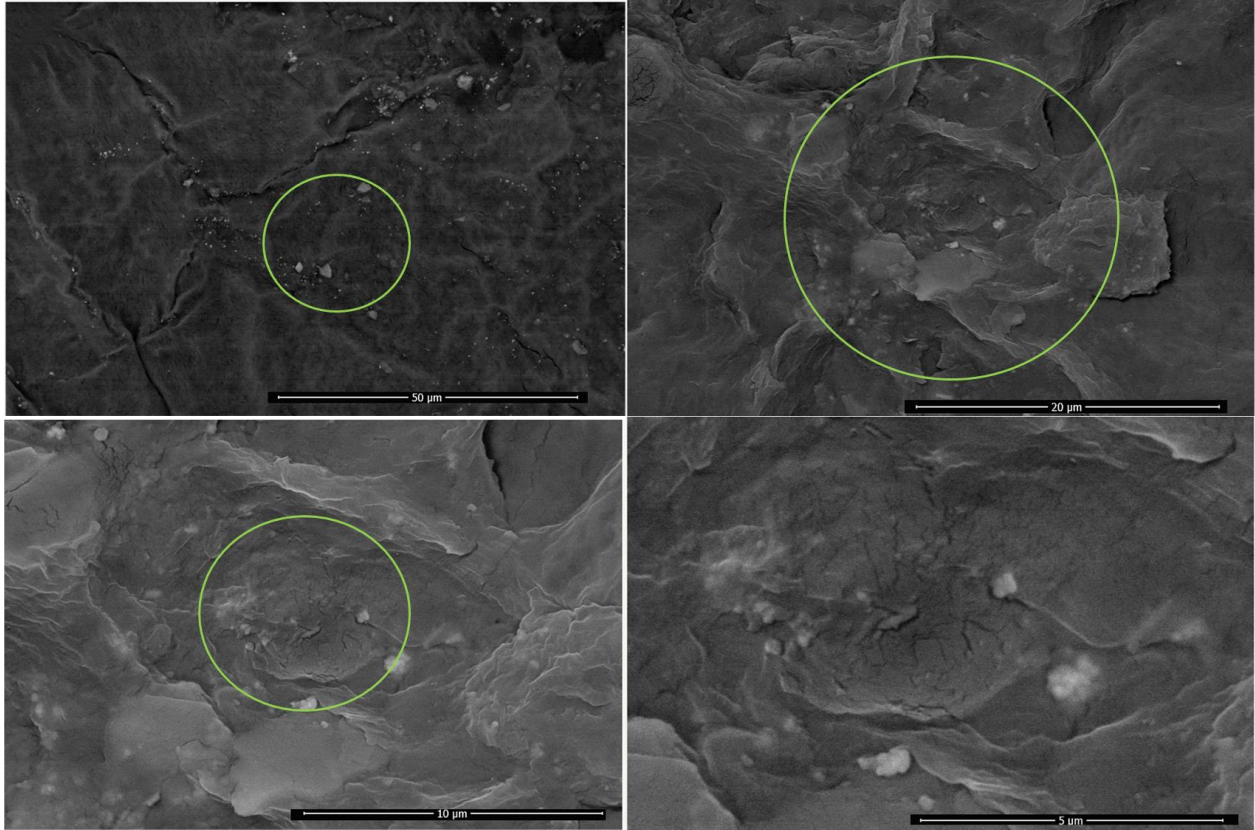
### 5.3.4 Morfología (SEM)

Las micrografías obtenidas revelaron que la muestra Q (figura 73) y la muestra Q/Se (figura 74) tienen una superficie lisa, homogénea y con pequeñas arrugas características de las marcas dejadas por el molde utilizado en el método de casting, lo que indica una buena compatibilidad entre el Q y el glicerol. Se observaron algunos puntos blancos en las imágenes, los cuales corresponden a residuos remanentes del proceso de filtración de la solución de quitosano previo al casting <sup>[141]</sup>. En cuanto a la identificación de SeNPs

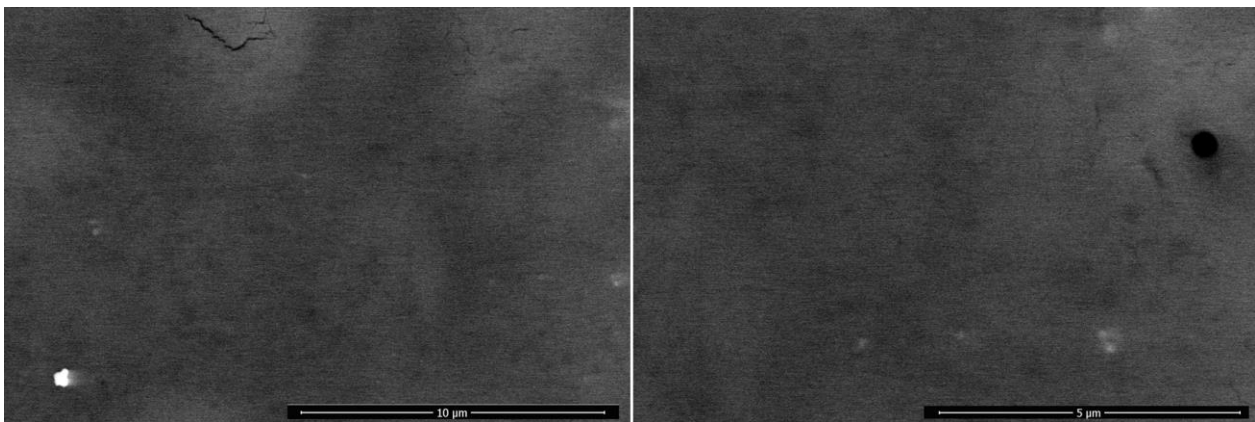
en la muestra Q/Se muestra un ligero agrietamiento en algunas áreas debido a que, al añadir NPs, la película adquiere una mayor rigidez y pierde flexibilidad. Esto es el resultado de una dispersión homogénea de las nanopartículas en la matriz de las películas plásticas <sup>[175]</sup>.

En el caso de las muestras Q/PVA (figura 75), exhibe una superficie heterogénea y un poco agrietada, que podría ser causa de la separación de micro fase entre quitosano y PVA, lo que significa que al momento de hacer la mezcla el quitosano se dispersó en la matriz del PVA, manteniendo sus propiedades mecánicas aisladas de cada uno de ellos <sup>[14]</sup>. Para la muestra Q/PVA/Se (Figura 76) se observa una porosidad baja y pocas grietas debido a la correcta dispersión entre quitosano y PVA, y la homogeneidad de la superficie indica también la distribución de SeNPs en la matriz del polímero, teniendo una compatibilidad alta entre los componentes, haciendo la muestra más densa y con más rigidez <sup>[175]</sup>.

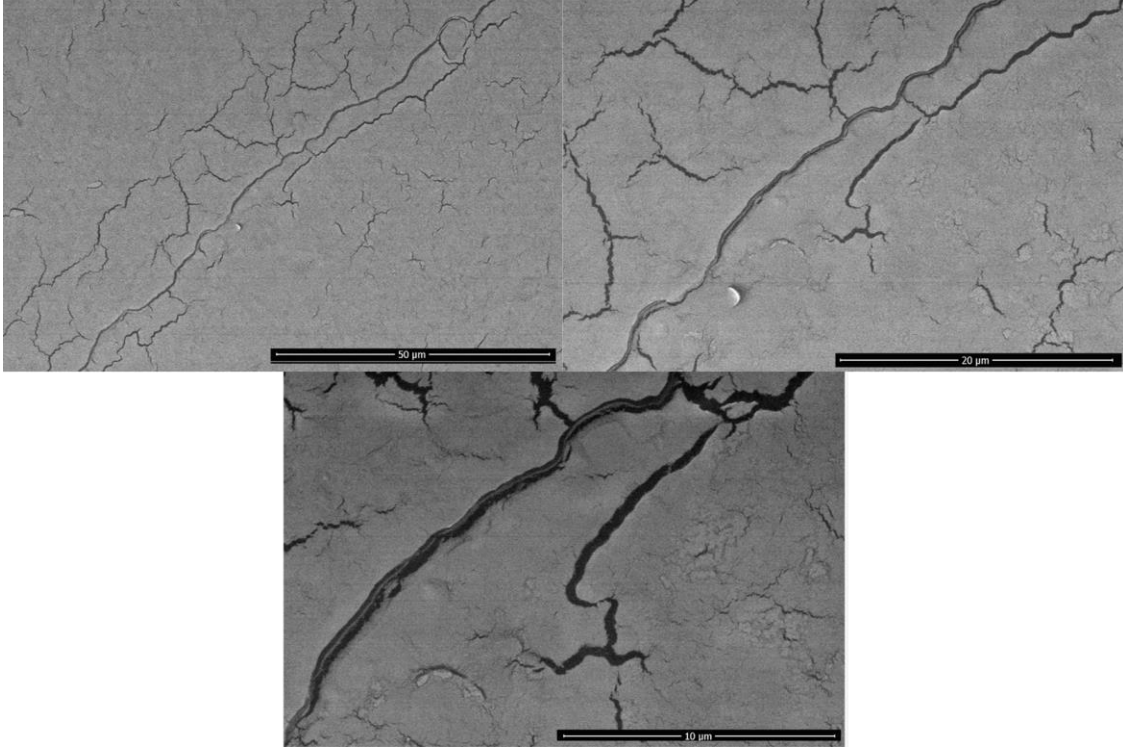
Estos resultados sugieren que el contenido de Q y PVA son directamente proporcionales a la estructura y morfología de las película y por el contrario son inversamente proporcional a la cantidad de glicerol añadido <sup>[179]</sup>.



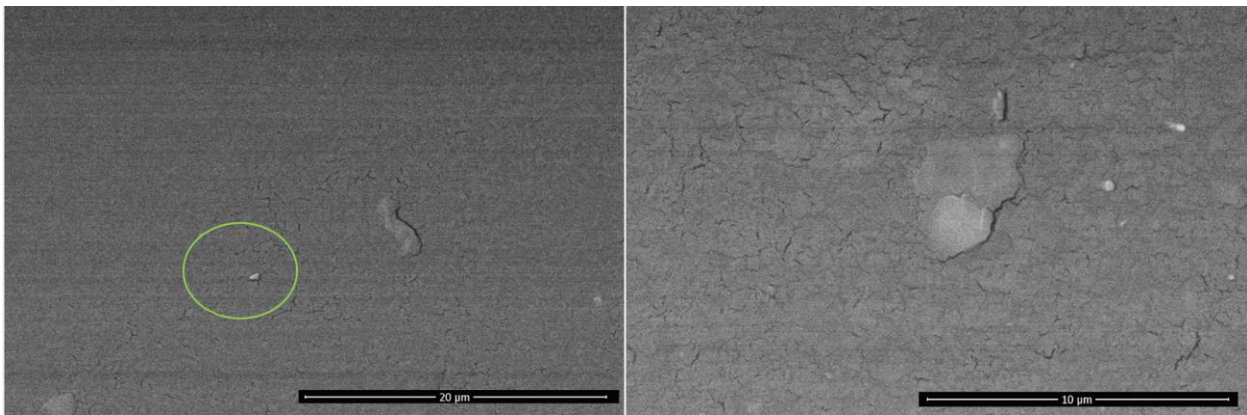
**Figura 73:** Imagen SEM de la muestra Q.



**Figura 74:** Imagen SEM de la muestra Q/Se.



**Figura 75:** Imagen SEM de la muestra Q/PVA.



**Figura 76:** Imagen SEM de la muestra Q/PVA/Se.

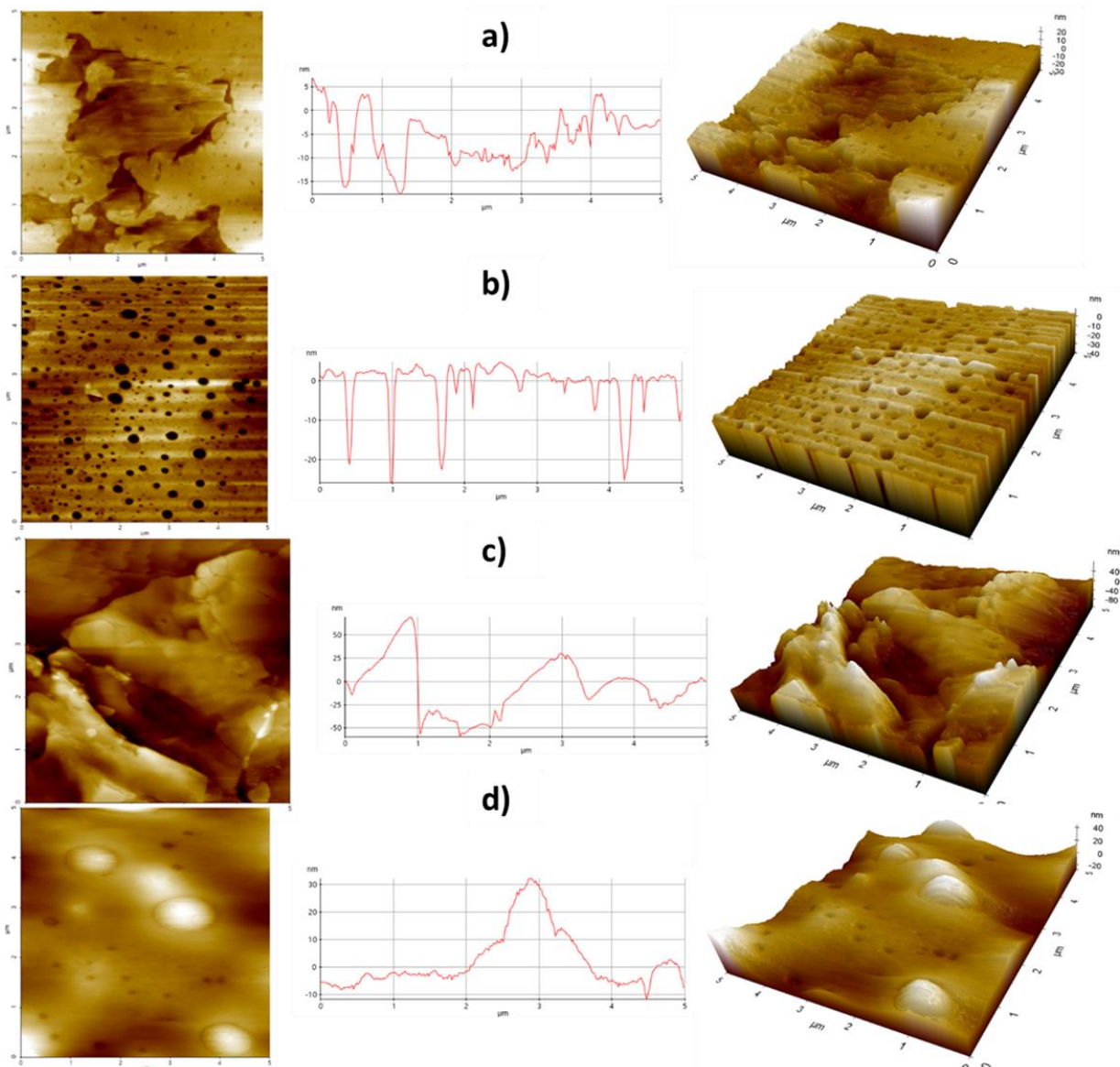
### 5.3.5 AFM

Las micrografías obtenidas por AFM se muestran en la figura 77, en primera instancia se observa una superficie uniforme con un poco de rugosidad, teniendo una morfología homogénea para la muestra Q (Figura 77 a). Sin embargo, la muestra Q/Se, se observa una porosidad alta. Estudios previos demostraron que si la mezcla de polímeros no tiene buena reticulación la película tendrá una estructura porosa <sup>[180]</sup>. Por lo que la mezcla entre Q, glicerol y SeNPs, podría no haber terminado su reticulación por completo (Figura 77 b).

Sin embargo, en las muestras que contienen PVA (Figura 77 c), se redujo la rugosidad y tienen una nula porosidad. Estudios previos comprueban que la mezcla de dos polímeros es influenciada por su afinidad y habilidad de mezclarse, lo cual influye directamente en la morfología de superficie de la película, lo cual podría ser causada por el aumento de la fuerza iónica en la solución polimérica, lo que causa disminución en las interacciones electroestáticas entre las cadenas poliméricas. Por lo que la interacción intermolecular de los polímeros mezclados da como consecuencia la estructura final de superficie. El peso molecular de los polímeros mezclados tiene también una gran importancia, porque las fuerzas de interacción electroestática entre los dos polímeros en la mezcla dan como resultado el incremento de tamaño de las micro imperfecciones.

La muestra Q/PVA/Se (Figura 77 d) ilustra una buena reticulación entre Q y PVA por su superficie con poca rugosidad y porosidad. El Q al ser un polielectrolito catiónico, forma una cadena estrecha en la solución ácida como resultado de la repulsión electroestática entre los grupos amino protonados. Ya que el PVA no procesa los grupos funcionales iónicos de la estructura, existe una alta compatibilidad entre estos dos polímeros mientras son mezclados, formando enlaces de hidrógeno entre ellos para formar la reticulación. Estos enlaces de hidrógeno previenen que otras cadenas se añadan y mejoran la mezcla <sup>[13]</sup>. La incorporación correcta de las SeNPs en esta muestra es evidente al observar protuberancias esféricas inmersas en la superficie y dispersas en toda la película. Las películas poliméricas que se clasifican como superficies antibacterianas se pueden dividir en dos tipos: superficies antiadherentes y superficies bactericidas. El primer tipo de superficie se caracteriza por una topografía desfavorable,

lo que impide el proceso de fijación de las células bacterianas a la capa exterior del material. La característica bactericida del segundo tipo de superficie se atribuye a la presencia de aditivos o estructuras especiales que provocan la desintegración de la membrana celular de las bacterias. Se ha descubierto que, en general, una mayor rugosidad de la superficie aumenta la adhesión de las células bacterianas [13]. Lo que hace que las muestras analizadas sean candidatas a utilizarse como superficies bactericidas gracias a su rugosidad.



**Figura 77:** Imágenes AFM de las muestras a) Q, b) Q/Se, c) Q/PVA d) Q/PVA/Se.

### 5.3.6 FTIR de las películas

En la tabla 26, se enlistan los principales grupos funcionales que se presentan en materiales de quitosano y PVA. En cada una de las muestras las bandas pertenecientes a vibraciones de estiramiento OH y C-H respectivamente aparecen ya que son grupos funcionales comunes en el Q y PVA <sup>[181]</sup> ( Q: 3247  $\text{cm}^{-1}$  y 2878  $\text{cm}^{-1}$ , Q/Se: 3288  $\text{cm}^{-1}$ , 2942  $\text{cm}^{-1}$ , Q/PVA: 3360  $\text{cm}^{-1}$  y 2938  $\text{cm}^{-1}$  y Q/PVA/Se: 3312  $\text{cm}^{-1}$ , 2934  $\text{cm}^{-1}$ ), en cuanto a las bandas de vibración de estiramiento de N-H aparecen en todas las muestras gracias a la presencia de quitosano(Q: 1549  $\text{cm}^{-1}$  , Q/Se: 1582  $\text{cm}^{-1}$  Q/PVA: 1584  $\text{cm}^{-1}$ , Q/PVA/Se: 1580  $\text{cm}^{-1}$ ) en cuanto a la muestra Q es la única con vibraciones de flexión de C-H con 1406  $\text{cm}^{-1}$  <sup>[182,183]</sup>. De igual forma en todas las películas plásticas aparece la banda de estiramiento de C-O (Q: 1024  $\text{cm}^{-1}$ , Q/Se: 1032  $\text{cm}^{-1}$ , Q/PVA: 1032  $\text{cm}^{-1}$ , Q/PVA/Se: 1040  $\text{cm}^{-1}$ ) <sup>[184]</sup>.

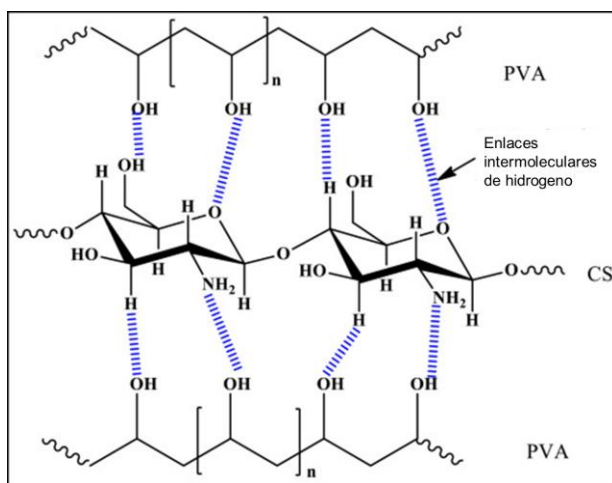
Al añadir glicerol como plastificante, ocasiona un cambio en las interacciones de los enlaces de hidrogeno, involucrando al grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) y grupo amido ( $-\text{NH}-$ ) del quitosano, haciendo que las cadenas tengan más movilidad <sup>[185]</sup>.

En cuanto al pico característico del Q cambia a un rango de frecuencia baja por que los enlaces de hidrogeno entre los grupos hidroxilo del PVA y los grupos amino del quitosano tienen interacción. Podemos ver una buena miscibilidad entre quitosano y PVA por el pico de absorbancia Q/PVA: 850  $\text{cm}^{-1}$  y Q/PVA/Se: 848  $\text{cm}^{-1}$  <sup>[186]</sup> Ver figura 79.

La diferencia de intensidades en algunas bandas, como es el caso de la muestra Q, es gracias a que las películas plásticas tienen una alta miscibilidad entre quitosano, PVA y glicerol <sup>[21]</sup>. (Figura 78)

Las muestras que contienen SeNPs de nuevo se identifican las bandas de absorción del grupo -OH, y CH que también está presente en la solución coloidal por los compuestos fenólicos que fungieron como cubrientes en la síntesis, así como C-C perteneciente a los flavonoides. Sin embargo, las bandas específicas de las dun rango de 400-200  $\text{cm}^{-1}$ ) pero se puede inferir que la correcta incorporación de SeNPs ente Q, PVA y glicerol fue buena <sup>[21]</sup>.

El espectro de las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se, muestran cambios característicos debido a la interacción de enlaces de hidrógeno entre grupos funcionales reactivos en el quitosano (-NH<sub>2</sub> y -OH) y PVA (-OH) donde la reticulación entre estos dos polímeros fue desarrollada [187], por lo que el espectro confirma una fuerte interacción entre los dos componentes.



**Figura 78:** Reticulación entre Q y PVA.

En la tabla 26 se tienen los principales grupos funcionales en las películas plásticas, y en la figura 79 se observa cada uno de los espectros para las películas plásticas. Así como en la figura 80 se tiene un comparativo de todas las muestras.

**Tabla 25:** Principales grupos funcionales presentes en las películas plásticas.

Muestra	OH	CH Alcano	C=O	N-H	C-H	C-O	C-C
Q	3247	2934	-	1549	1406	1024	-
Q/Se	3288	2942	1708	1582	-	1032	-
Q/PVA	3360	2938	1712	1584	-	1038	850
Q/PVA/Se	3312	2934	1710	1580	-	1040	848

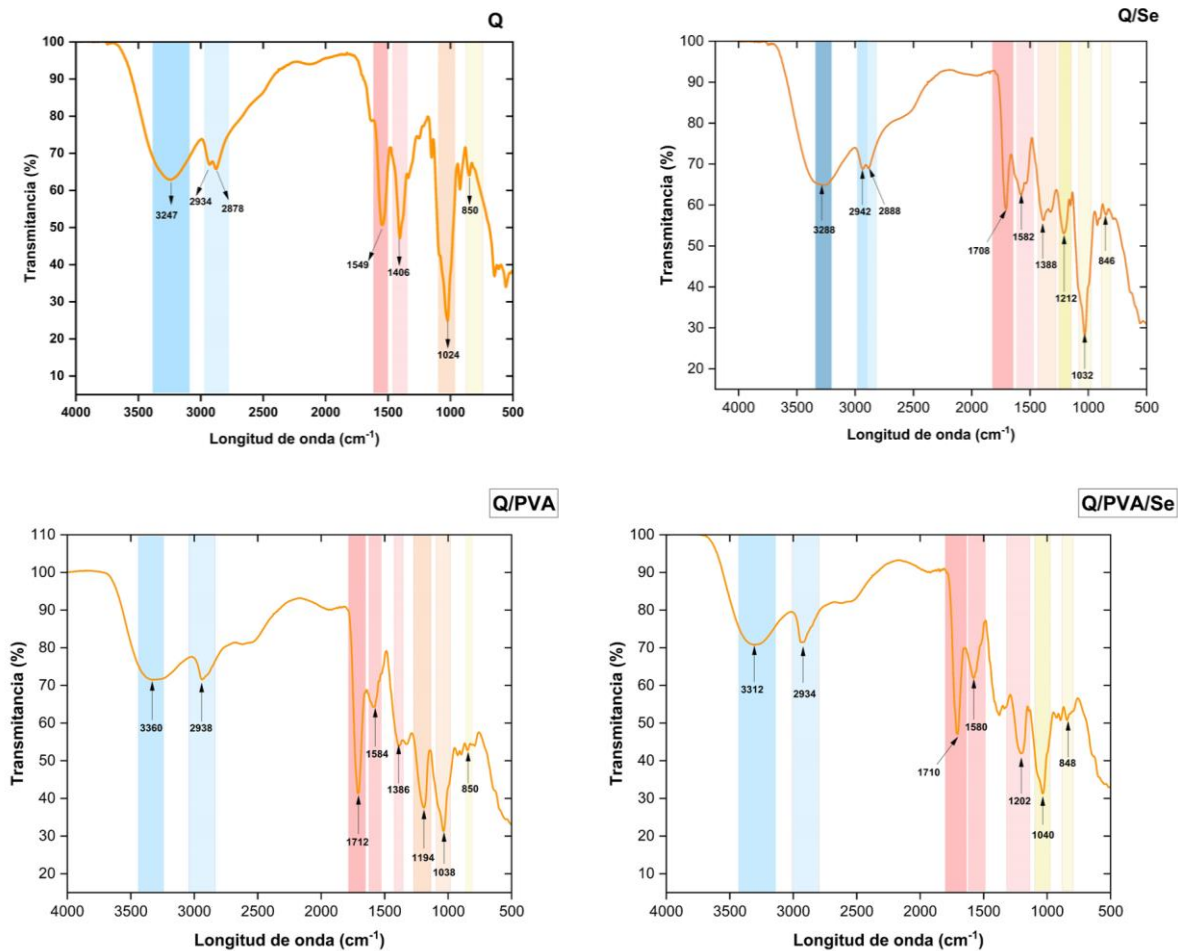


Figura 79: Espectros FTIR para las películas plásticas: a) Q, b) Q/Se, c) Q/PVA d) Q/PVA/Se.

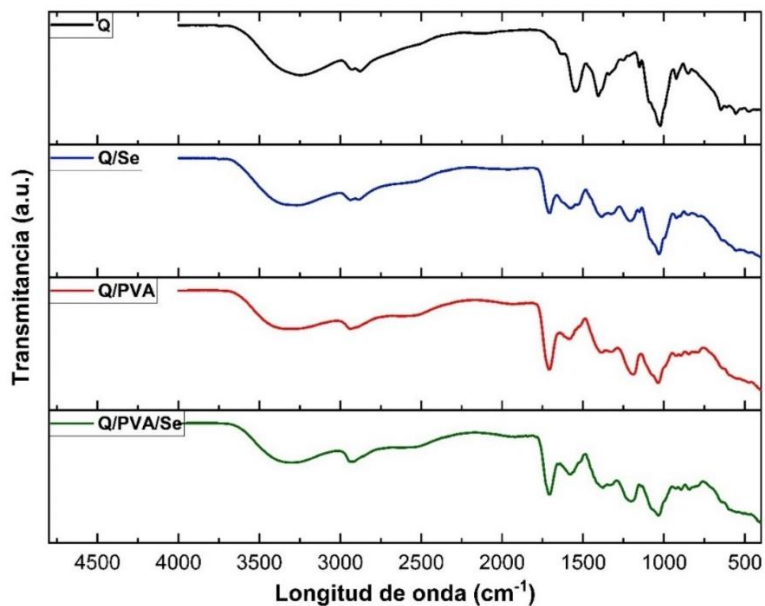


Figura 80: Espectros infrarrojos comparativos de cada una de las películas plásticas.

### 5.3.7 TGA

La muestra Q (figura 81) contiene las curvas de TG y DTG, con 4 etapas de pérdida de peso del material, la primera etapa está localizada aproximadamente a los 50 °C y se debe a la pérdida de agua presente en la muestra <sup>[146]</sup>, la cual fue de 0.41%.

A los 150 °C con una pérdida de peso de 6.15% se presenta la segunda etapa que corresponde a la degradación del glicerol, cabe destacar que el glicerol tiene una temperatura de descomposición (Td) inferior a la del quitosano, lo que resulta en una reducción de la estabilidad térmica del polímero. Esta descomposición debilita los enlaces de hidrógeno en la red del quitosano, promoviendo la movilidad de las cadenas moleculares y, en consecuencia, reduciendo la cristalinidad <sup>[188]</sup>.

La tercera etapa comienza a partir de los 200 a 270 °C (Td) con una pérdida de peso del 23.87% que corresponde a la temperatura de degradación térmica del polímero de quitosano, hasta llegar a su degradación que comienza a los 430 °C, teniendo un residuo final de 20.32%, el cual corresponde a los minerales y compuestos inorgánicos presentes en la solución de quitosano utilizada para la fabricación del polímero <sup>[141]</sup>.

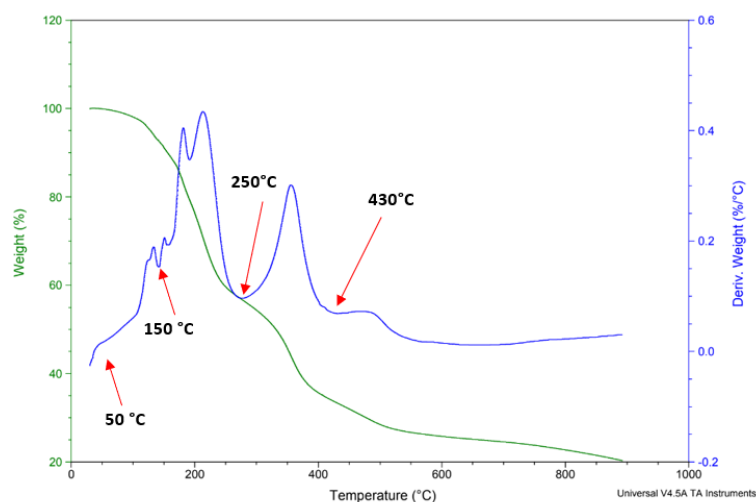
La muestra Q/Se (figura 82) también tiene 4 etapas de pérdida de peso, 124 °C correspondiente a la pérdida de humedad de agua (3.95%), 242°C a la degradación de glicerol (14.77%), 390 °C a la degradación térmica del polímero (24.06%), 300-400 °C donde comienza la degradación de SeNPs (5.28%) y finalmente a los 440 °C comienza la degradación total teniendo un residuo de 21.58%.

Se observa una leve diferencia en las etapas de degradación y la temperatura, ya que las nanopartículas de selenio en el polímero, tienden a hacer menos cohesiva la película y por lo tanto es menos estable térmicamente.

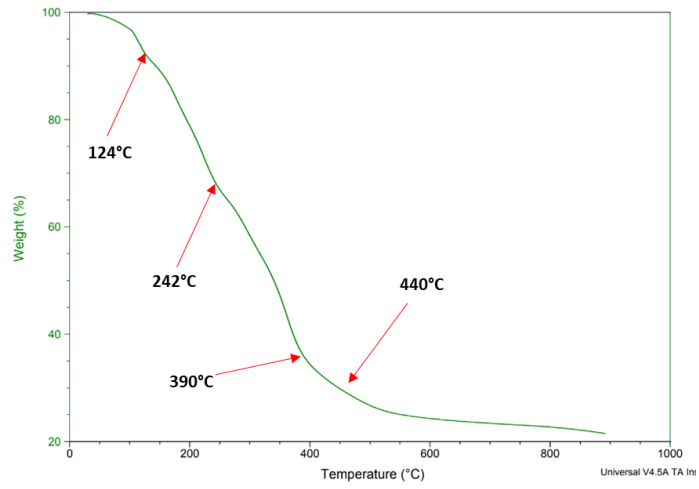
Para la muestra Q/PVA (figura 83) se presentaron 4 etapas de pérdida de peso del material: 128 °C para la pérdida de humedad de agua (5.22%), 247 °C para la degradación de glicerol (10.77%), 390 °C degradación térmica del PVA (24.69%) y 550 °C para la degradación total, con un residuo final de 19.78%.

Por último, la muestra Q/PVA/Se (figura 84), con 4 etapas de pérdida de peso 108 °C de humedad de agua (1.23%), 230 °C de degradación de glicerol (2.97%), 330 °C degradación térmica del polímero (1.30%), 300°C - 400°C degradación de PVA (16.10%) y SeNPs y 530 °C para la degradación total con un residuo de 20.59%.

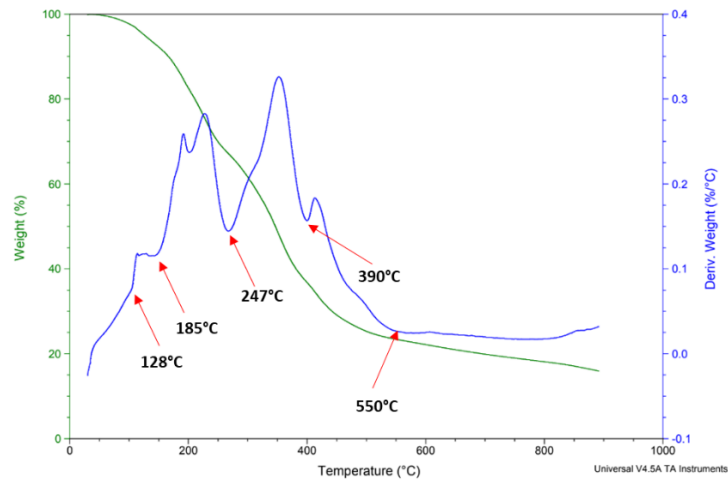
Las propiedades térmicas del PVA son más estables que las del Q. Es por eso que en las muestras Q y Q/Se la masa disminuyo gradualmente desde el comienzo del proceso de calentamiento hasta alcanzar más de 300 °C donde ocurre el rompimiento parcial de las estructuras moleculares y la desintegración intermolecular de los enlaces [13]. Las muestras que contienen PVA tienen una mayor estabilidad térmica gracias a la formación de puentes de hidrogeno de la reticulación de quitosano y PVA, así como la presencia de SeNPs en la muestra Q/PVA/Se, como se comprobó en el estudio FTIR. Los cambios en la cristalinidad de la mezcla de polímeros en la película plástica la cual se obtiene después de los 300 °C, es causada por las interacciones en la región amorfa, las cuales son más débiles que las interacciones semicristalinas del Q y el PVA [189] comenzando a degradarse térmicamente, lo que tiene como resultado la formación de aldehídos y alquenos en estado fundido. Las muestras Q y Q/Se mostraron mayor estabilidad térmica (menos pérdida de peso) que las que contienen PVA, por lo que se entiende que entre mayor sea la cantidad de quitosano agregado al polímero mayor será la estabilidad térmica y más lenta la pérdida de peso. Por lo que el balance entre Q y PVA en las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se, las hace la mejor opción.



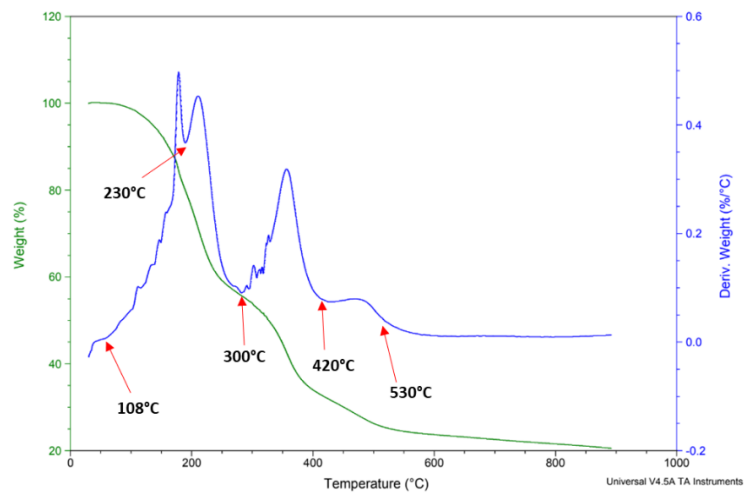
**Figura 81:** Curvas Tg y DTG para Q.



**Figura 82:** Curva Tg para a) Q/Se.



**Figura 83:** Curva TG y DTG de Q/PVA.



**Figura 84:** Curva TG y DTG para Q/PVA/Se.

### 5.3.8 DSC

Los termogramas DSC (figura 85) para cada película plástica muestran un pico endotérmico y uno exotérmico. En cada muestra el pico endotérmico corresponde a la transición vítrea ( $T_g$ ) del polímero en las temperaturas de 194 °C para Q, 191 °C para Q/Se, 194 °C para Q/PVA y 190 °C para Q/PVA/Se, que indica el cambio de estado del quitosano de un estado vítreo a uno gomoso. Este evento está asociado con un incremento en la naturaleza viscoelástica del material. Se espera que, posterior a esta temperatura, se observe un pico que indique el punto de fusión. Sin embargo, debido a la naturaleza polisacárida del Q, este no presenta una fusión en sentido estricto como otros polímeros, pero sí experimenta degradación térmica a temperaturas relativamente bajas. Por consiguiente, a los 370 °C en Q, 300 °C en Q/Se, 362 °C en Q/PVA y 265 °C para Q/PVA/Se, se puede observar el pico exotérmico en cada muestra, correspondiente a la degradación térmica del Q. En este punto, la estructura molecular del Q se ve afectada por el inicio de la degradación de las unidades de glucosamina presentes en su composición <sup>[141]</sup>. La transición vítrea ( $T_g$ ) de las películas de Q, varían dependiendo el método, tiempo y temperatura de extracción así como la materia prima, por lo que en estudios previos se han obtenidos temperaturas de  $T_g$  que van desde los 180 °C hasta los 250 °C, por lo que los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas en este estudio entran en ese rango <sup>[190]</sup>. La degradación del quitosano se tiene reportada con un pico exotérmico de entre 270 °C – 350 °C, por lo que de igual forma las muestras están en este rango.

No existe variación en el valor de la  $T_g$  ni de la temperatura de degradación en las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se, ya que esto indica que las interacciones moleculares de los enlaces de hidrogeno en la reticulación entre Q y PVA están presentes, por lo que se afirma la buena miscibilidad entre estos dos polímeros en las plásticas. Sin embargo, esto afecta el proceso de cristalización del PVA, por lo que esta temperatura es considerada como medida de compatibilidad de la mezcla <sup>[190]</sup>, Figura 86

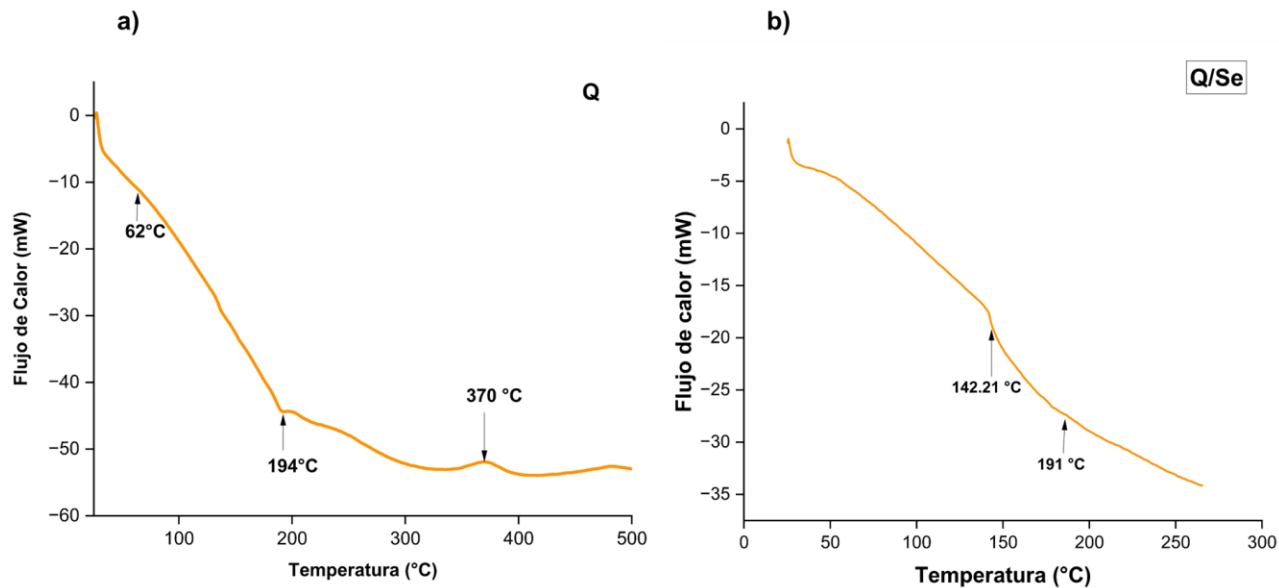


Figura 85 Termograma DSC para a) Q y b) Q/Se

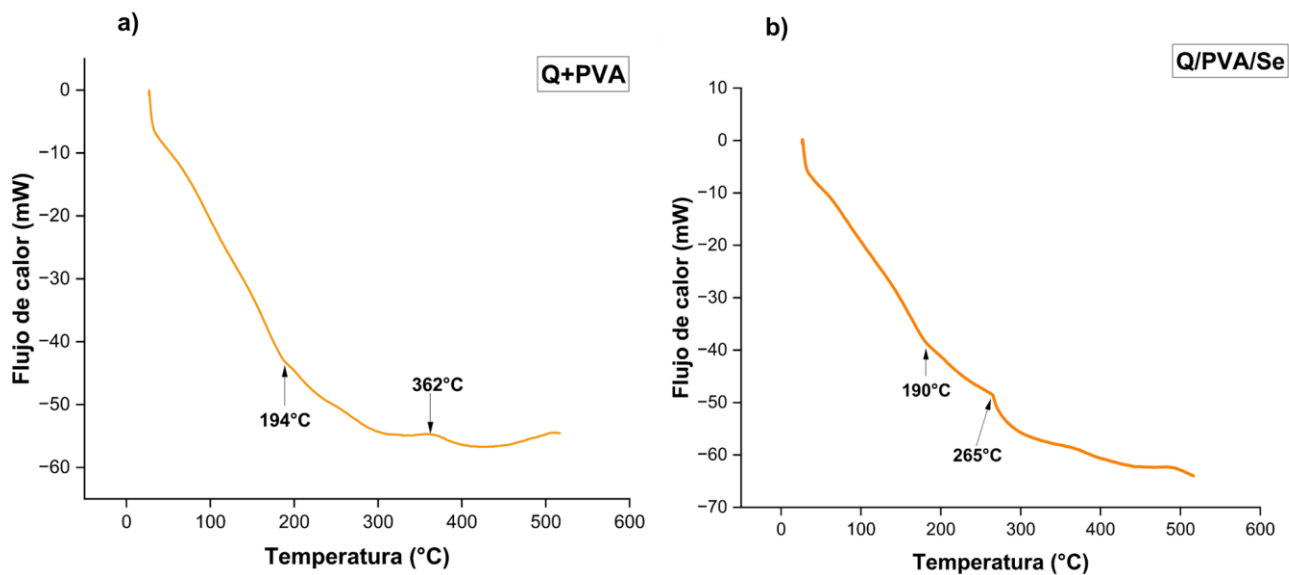


Figura 86: Termograma DSC para a) Q/PVA y b) Q/PVA/Se

### 5.3.9 Pruebas mecánicas: Esfuerzo de tracción, elongación y módulo de Young

Entre las propiedades mecánicas más importantes a analizar para aplicaciones en empaque se encuentran la elasticidad, flexibilidad, elongación y esfuerzo de tracción [183]. Ya que deben mantener su integridad para resistir el estrés que se produce durante el envío, manipulación y almacenamiento [190]. Para la verificación del cumplimiento de estas propiedades se evaluaron las propiedades mecánicas (esfuerzo de tracción, elongación a la rotura y módulo de Young), de las películas plásticas. En la Figura 87, se presenta el gráfico esfuerzo-deformación de las distintas películas plásticas elaboradas por casting, mientras que la Tabla 27 enumera los valores los parámetros mecánicos importantes extraídos del gráfico.

El esfuerzo de tracción máximo obtenido fue para la muestra Q/PVA/Se con 1.5 Mpa, debido a que los enlaces de hidrógeno entre el quitosano y el PVA teniendo interacción entre los grupos -OH del PVA con los grupos -NH<sub>2</sub> del quitosano lo que ocasiona un refuerzo en la estructura de la red, mejorando así la resistencia mecánica [190]. En segundo lugar, se encuentra la muestra Q con 0.935 Mpa, resultado de influencia de la cantidad de glicerol añadido. La muestra Q/PVA tiene un esfuerzo de tracción de 0.823 Mpa el cual nos muestra su correcta reticulación de los polímeros. En último lugar se encuentra la muestra Q/Se con 0.428 Mpa, debido a la incorporación de SeNPs en la mezcla de quitosano, ocasionando rigidez en la muestra.

El módulo de Young tiene un aumento considerable en las muestras Q/Se y Q/PVA/Se, debido a la presencia de SeNPs. El alargamiento a la rotura se ve disminuido en las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se, debido a la presencia de PVA.

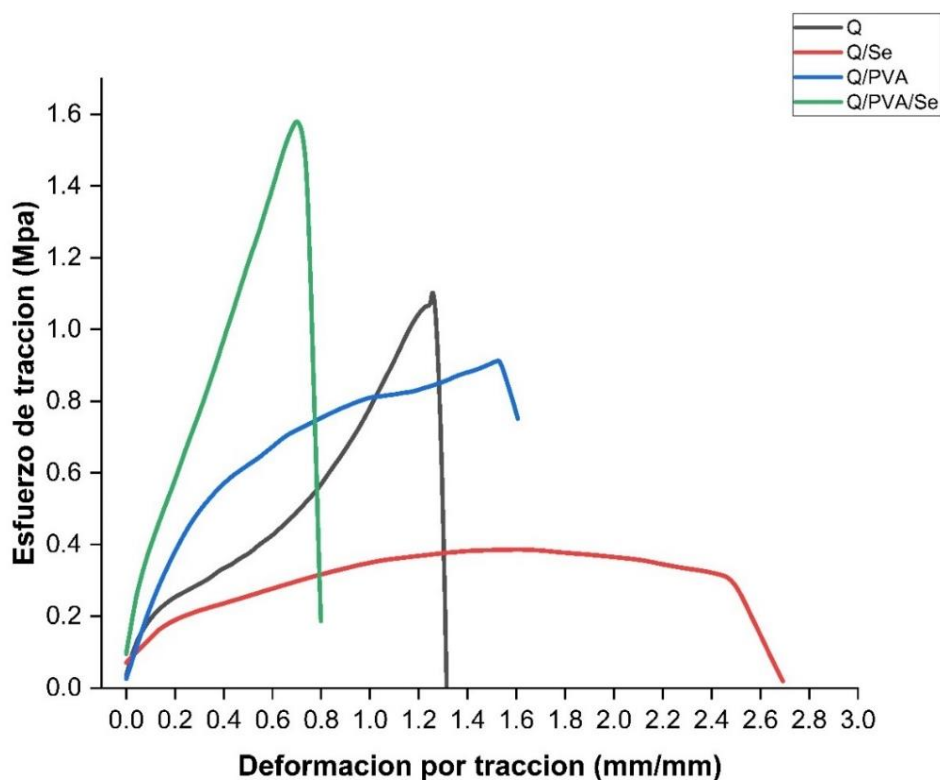
En cuanto al alargamiento a la rotura está relacionado con la cantidad de quitosano que tiene la película, entre más quitosano tenga, mejores resultados de alargamiento a la rotura tendrán, ya que, en presencia de PVA, los puentes de hidrogeno que se forman vuelven más rígido el material. Por lo que la muestra Q/PVA/Se es la que tiene menor alargamiento a la rotura con un 65.87%, que a diferencia de la muestra solo con PVA, con 140 %, se redujo gracias a la presencia de SeNPs. Al comparar el gráfico esfuerzo-deformación obtenido para cada una de las muestras con el de otros polímeros utilizados

en la industria del embalaje alimenticio, según la literatura se observa que su capacidad de tracción es mucho menor [191].

Al incorporar glicerol como plastificante, se redujo la interacción y proximidad entre las cadenas reticuladas. Por ello al aumentar la concentración del plastificante, el espacio entre la matriz polimérica aumenta, y también la flexibilidad y la permeabilidad de las películas plásticas. Los plastificantes interfieren con la cadena del polímero al disminuir las fuerzas intermoleculares, suavizar la rigidez de la estructura de la película y aumentar la movilidad del polímero, disminuyendo así la resistencia a la tracción y haciendo que las películas sean más flexibles y extensibles [8] .

**Tabla 26** Propiedades mecánicas de las películas plásticas.

Muestra	Esfuerzo de tracción (Mpa)	Desviación estándar	Alargamiento a la Rotura (%)	Desviación estándar	Módulo de Young (Mpa)	Desviación estándar
Q	0.935462	0.317	186.31	90.33	1.565	0.445
Q/Se	0.4289	0.0335	284.64	81.22	6.43	4.95
Q/PVA	0.8233	0.1095	140.71	24.2845	1.5928	0.4979
Q/PVA/Se	1.5001	0.2576	65.87	9.88	4.054	1.2875



**Figura 87** Curva esfuerzo deformación de las películas plásticas.

### 5.3.10 Análisis microbiológico (difusión en agar)

Los halos promedio de inhibición generados por las distintas películas plásticas antes las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, se muestran en la tabla 28 y figura 89.

El efecto antibacteriano con mejores resultados para la bacteria *E. coli*, fue la muestra Q/Se con una zona de inhibición de 27 mm y de 30.56 mm para *S. aureus*. En comparativo con la muestra Q (20.7 mm para *E. coli* y 21.3 para *S. aureus*), su capacidad antibacteriana aumentó considerablemente, esto debido a la presencia de SeNPs en la muestra Q/Se.

En cuanto a las películas plásticas realizadas con mezclas de quitosano y PVA obtuvieron efectos antibacterianos positivos. Aunque la inhibición bacteriana para *E. coli* fue menor cuando se agregó PVA a las muestras, siguen teniendo buenas propiedades antibacteriales. La muestra Q/PVA para *E. Coli* tiene un menor diámetro en su halo de inhibición (25.96 mm) que la muestra Q/PVA/Se que contiene SeNPs (25.6 mm), pero la diferencia no es significativa, sin embargo, para *S. aureus* (Q/PVA: 25.9 mm y Q/PVA/Se: 28.6 mm), la diferencia entre el halo de inhibición entre estas dos mismas muestras si aumenta considerablemente al añadir SeNPs

Una explicación a esta inhibición en las películas plásticas sin SeNPs se encuentra en el peso molecular del Q y su estructura. Referente al peso molecular, el Q extraído, al tener un peso molecular bajo, adquiere una forma extendida de sus cadenas poliméricas y relajada a comparación de las de alto peso molecular <sup>[192]</sup>. El mecanismo antimicrobiano del Q se debe a la protonación del grupo amino cuando está en un medio ácido, esto provoca interacciones iónicas con la membrana celular de la bacteria, ocasionando la hidrólisis de peptidoglicanos provocando que esta se rompa y haya fuga de electrolitos intracelulares, haciendo que el microorganismo muera <sup>[193]</sup>. Se ha encontrado que la barrera lipídica de la membrana celular tanto de *E. coli* como de *S. aureus* al estar en contacto directo con el quitosano se rompe ocasionando filtración de ADN y mRNA en la periferia de la célula ocasionando apoptosis bacteriana <sup>[194]</sup>. El peso molecular del quitosano influye de manera directa en lo anterior antes mencionado, así

como la presencia de plastificante glicerol, ya que esto puede aumentar su actividad antibacterial [179]. En la figura 88 se ve este mecanismo.

En cuanto a la presencia de SeNPs, estas originan un aumento en la capacidad antibacterial de las películas plásticas, ya que los iones de selenio penetran en la pared celular de la bacteria, sin embargo, no actúan con la misma eficiencia para las bacterias Gram positivas (*S. aureus*) que tienen una red molecular más fuerte en la pared celular que las bacterias Gram negativas (*E. coli*). Por lo que las SeNPs penetran más fácilmente sobre la barrera lipídica de las bacterias Gram negativas, Menazea et al. reportó este mismo comportamiento en una mezcla de quitosano y PVA dopadas con SeNPs sintetizadas por ablación laser. [21].

Las muestras Q/Se y Q/PVA/Se presentan las mejores propiedades antibacterianas debido a la combinación de las propiedades del grupo amino  $-NH_3$  del quitosano y los iones de Selenio de las nanopartículas, siendo la mejor opción para evitar la contaminación por bacterias de los alimentos. (Figura 90)

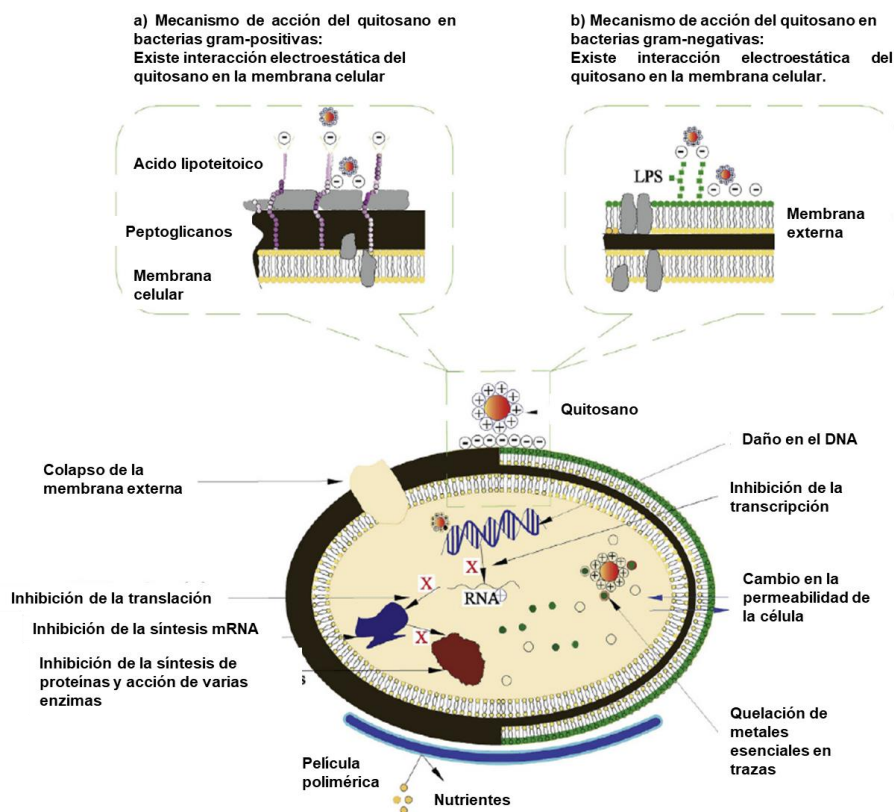
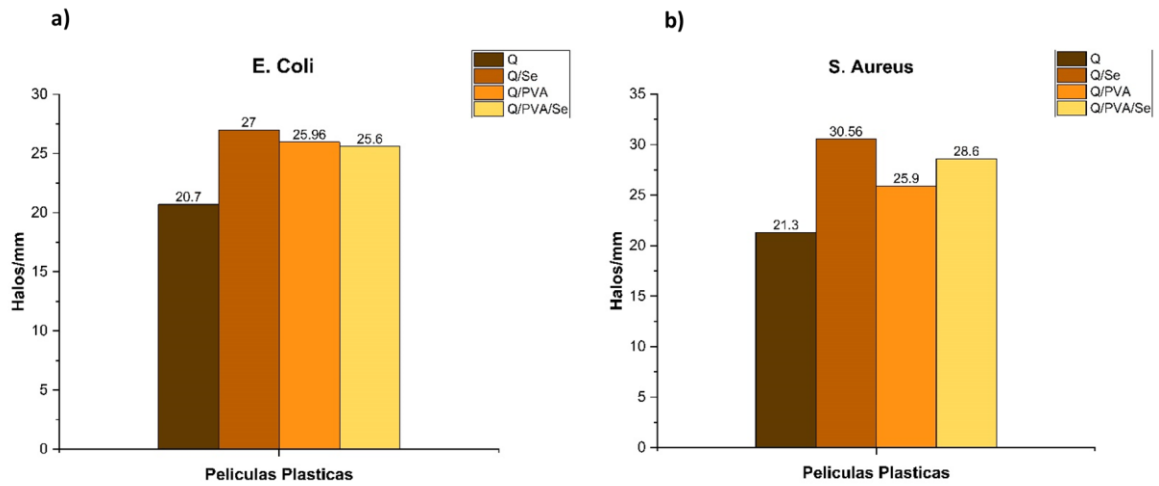


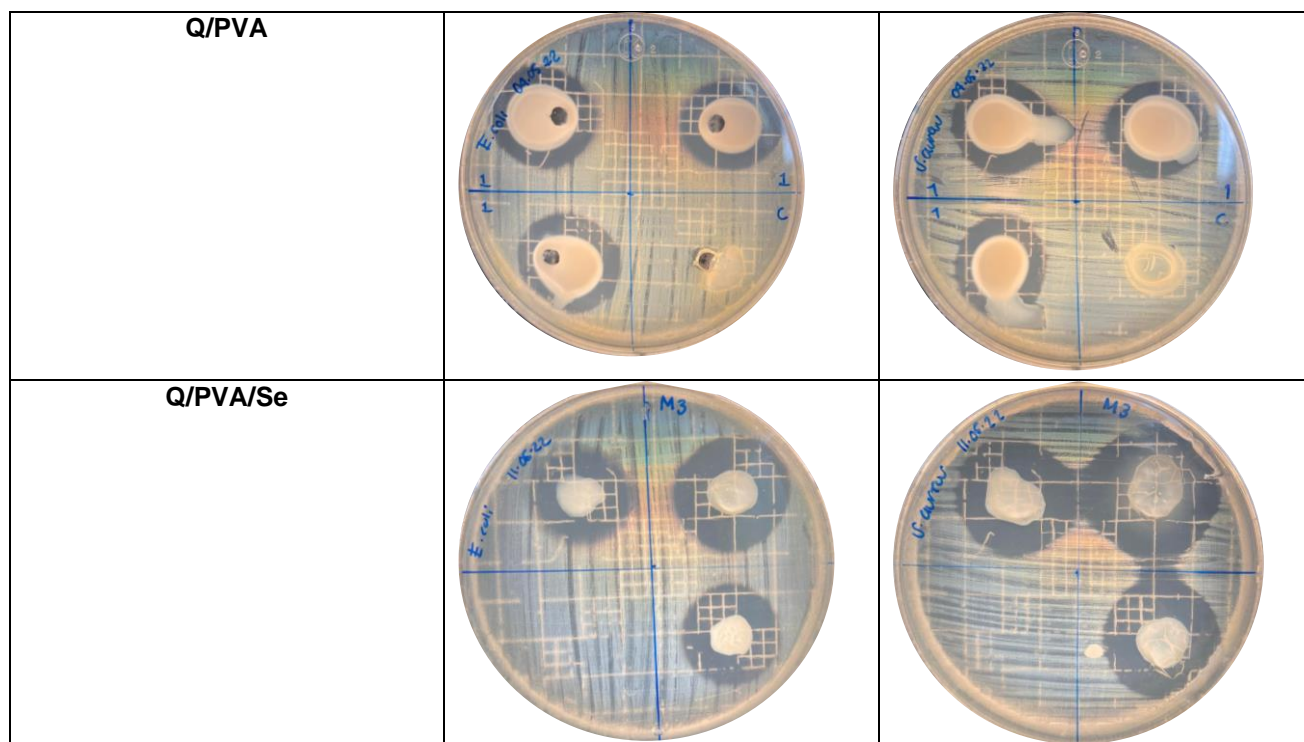
Figura 88: Mecanismo de acción antibacteriana del quitosano en bacterias [194].



**Figura 89:** Promedio de diámetros de inhibición para las películas plásticas. a) *E. coli*, b) *S. aureus*

**Tabla 27:** Actividad antibacteriana de las películas plásticas.

Muestra	<i>E. Coli</i>	<i>S. Aureus</i>
Q		
Q/Se		



### 5.3.11 Biodegradabilidad en el suelo

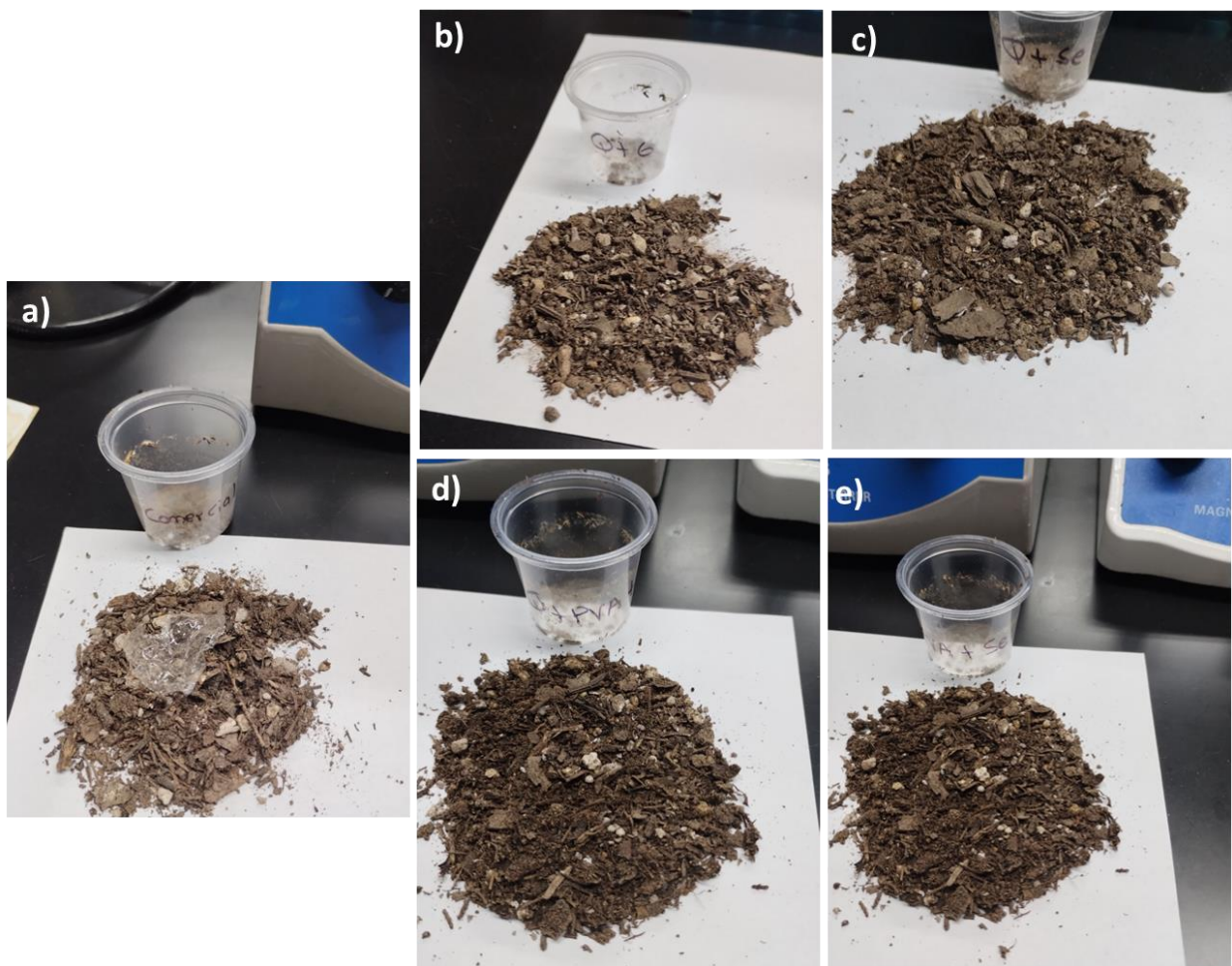
La degradación de las películas plásticas durante 15 días, fue completa. La despolimerización de las películas plásticas ocurre debido a que los microorganismos presentes en la tierra rompen la cadena polimérica y la hacen más corta facilitando la degradación debido en gran parte al  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  que se encuentran en la tierra <sup>[195]</sup>.

En los primeros días, se detectaron cambios mínimos en el peso, debido a que los microorganismos tienen un periodo de adaptabilidad a las nuevas condiciones, pero una vez adaptados al medio, crecen con mayor velocidad y digieren los biopolímeros rápidamente <sup>[196]</sup>.

Cuando las películas plásticas de Q se someten a biodegradación, se desarrolla una serie compleja de procesos que conducen al rompimiento de las cadenas poliméricas y su transformación en compuestos más simples. Al inicio de la biodegradación, el agua impregna la película de Q, iniciando un proceso de hinchazón promoviendo la difusión de enzimas y microorganismos hacia la matriz de la película. La degradación enzimática es uno de los principales mecanismos responsables de la descomposición de las

películas de quitosano. Algunas enzimas, como, la lisozima y las proteasas, actúan sobre los enlaces glicosídicos presentes en el quitosano, hidrolizándolos en fragmentos más pequeños

El resultado fue positivo para una óptima biodegradabilidad de las películas en el suelo, donde la basura se vierte y entierra casualmente [197]. El análisis se realizó de igual manera una película plástica de polipropileno comercial, la cual tuvo un cambio de peso mínimo y sin ningún cambio físico aparente. Los resultados cualitativos se muestran en la figura 90.



**Figura 90:** Degradación en tierra de películas plásticas: a) Polipropileno comercial b) Q, c) Q/Se, d) Q/PVA, e) Q/PVA/Se.

### 5.3.12 Aplicación en uvas verdes (apariencia)

La uva que no fue cubierta con ningún tipo de película comenzó a cambiar de color desde el día 3, así como a perder peso, al final de los 10 días, su color cambio totalmente a café oscuro, y su tamaño se redujo considerablemente debido a la oxidación. En cuanto a la uva que fue cubierta con la película de polietileno cambio a un color café oscuro, pero su peso no tuvo cambios significativos, de hecho, la humedad se quedaba impregnada en la película plástica sin dejarla respirar. Ocasionando que se generara moho en los bordes de la uva. Sin embargo, este tipo de cambios no se desarrollaron de la misma forma en las uvas recubiertas con los polímeros de Q.

En la muestra Q, un ligero cambio de color comenzó a verse a partir del día 3 desde las orillas de la uva, y fue creciendo de manera lenta hasta que en el día 8 fue más notorio. La muestra Q/Se de igual forma comenzó el cambio de color en las orillas hasta expandirse lentamente, hasta que en el día 7 cambio a café claro en toda la extensión de la fruta.







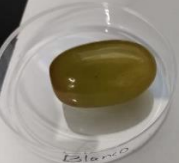



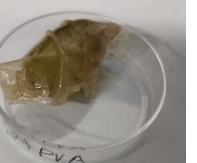




















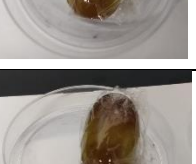



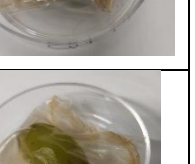




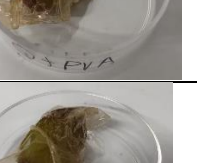


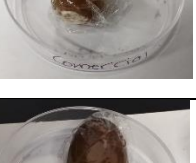


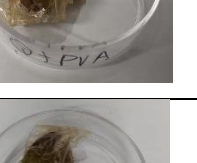

Para la uva que fue recubierta con la película Q/PVA el cambio de color comenzó desde el día 3 en una orilla, pero no cambio totalmente de color, manteniéndose en las orillas hasta los 10 días. Finalmente para la película plástica Q/PVA/Se sucedió un comportamiento similar en el cambio de color.

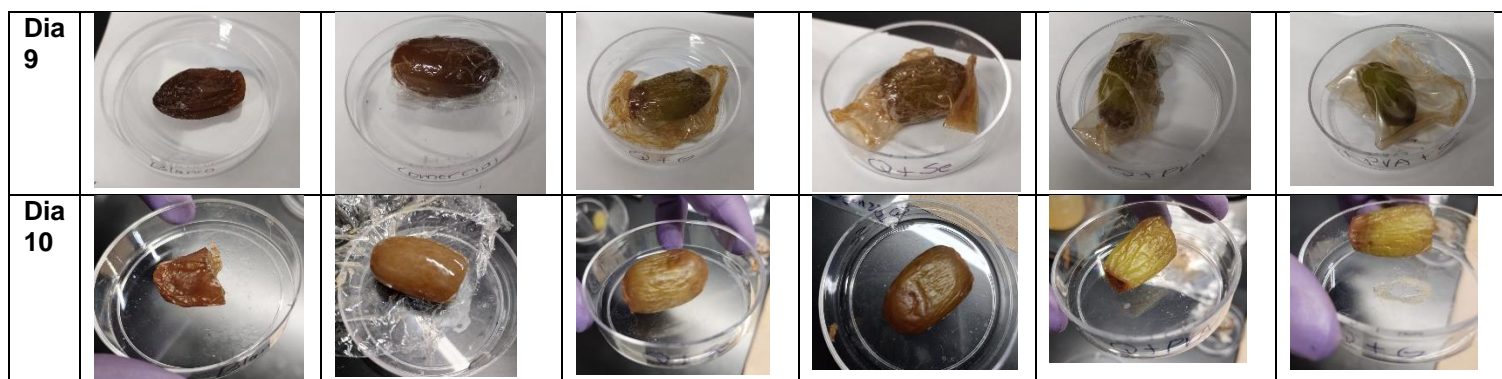
A diferencia de la película de polietileno, ninguna uva recubierta con las 4 muestras elaboradas, desarrolló crecimiento de algún tipo de moho ni contaminación por algún tipo de microorganismo. Debido a la propiedad antimicrobiana del Q <sup>[64]</sup> y la presencia de SeNPs <sup>[160]</sup> lo que ayuda a salvaguardar los alimentos por más tiempo.

Las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se fueron las que obtuvieron mejores resultados, en cuanto a degradación de la fruta, así como degradación de la película en sí.

En la tabla 29 se tiene la apariencia visual de las uvas en los 10 días de exposición.

**Tabla 28:** Apariencia visual de las uvas durante 10 días de almacenamiento de las muestras.

	<b>Blanco</b>	<b>Comercial</b>	<b>Q</b>	<b>Q /Se</b>	<b>Q/PVA</b>	<b>Q/PVA/Se</b>
<b>Dia 0</b>						
<b>Dia 1</b>						
<b>Dia 2</b>						
<b>Dia 3</b>						
<b>Dia 4 y 5</b>						
<b>Dia 6</b>						
<b>Dia 7</b>						
<b>Dia 8</b>						



### 5.3.13 Pérdida de peso en uvas verdes (WLR%)

Las uvas que presentaron una menor pérdida de peso fueron las que fueron cubiertas con la muestra Q con un 28% de pérdida de agua, la que más % de pérdida de peso obtuvo fueron las muestras Q/PVA y Q/PVA/Se con un 35%. Teniendo una variación de 7% en promedio de pérdida de peso entre las que contienen PVA y las que no. Existe una notable diferencia de pérdida de peso con la muestra de la película de polipropileno comercial, la cual solo perdió el 7% de peso. La presencia de PVA ocasiona un aumento la permeabilidad de las películas a diferencia de las películas con solo Q esto debido a la capacidad hidrofílica del grupo hidroxilo del PVA y de la presencia de glicerol. Sin embargo, en comparativa con la uva que no fue recubierta, la cual perdió el 57% de su peso, las películas plásticas desarrolladas ayudan a retrasar la pérdida de humedad y la deshidratación de la fruta. En la tabla 30 se muestra el porcentaje de peso perdido de las uvas recubiertas con películas plásticas y en la figura 91 se ve la pérdida de peso gradual día a día de cada película plástica utilizada en las uvas verdes.

**Tabla 29:** Porcentaje en pérdida de peso de las uvas recubiertas.

WLR	Blanco	Comercial	Q/G	Q/Se	Q/PVA	Q/PVA/Se
%	57.59	7.02	28.49	29.16	35.33	35.41

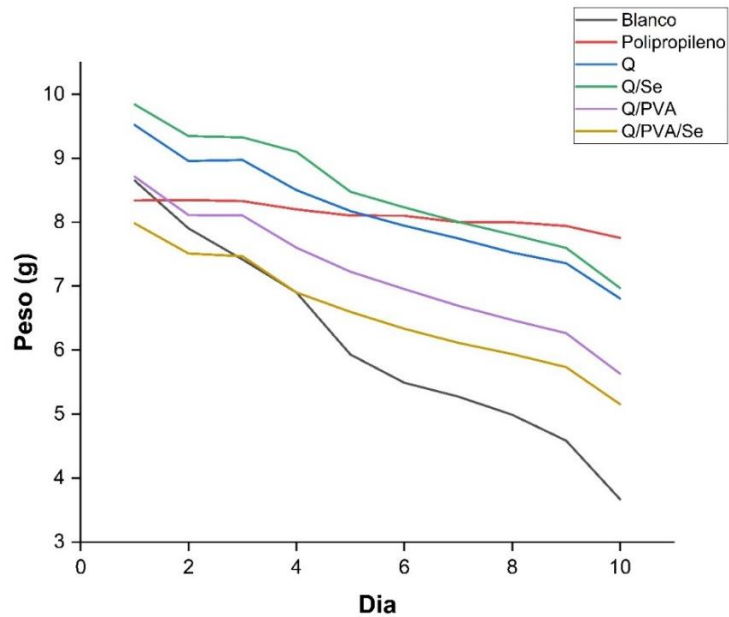


Figura 91: Pérdida de peso en uvas verdes durante 10 días.

### 5.3.16 Acidez total en uvas verdes

Los resultados obtenidos para el porcentaje de acidez de las uvas verdes se observa en la tabla 31, donde se indica el grado de madurez al que llegó la fruta al final de su almacenamiento con las películas plásticas. La muestra Q/PVA fue la que obtuvo un menor porcentaje de acidez con un 0.57%, seguida de Q/PVA/Se con un 0.64%, que comparándolo con la muestra sin recubrir y la muestra recubierta con la película comercial, fue mucho menor. La reducción de los ácidos orgánicos en las uvas es debido a que la fruta se ve forzada a consumir parte de sus propios ácidos como parte de su proceso metabólico [16].

Tabla 30: Porcentaje de acidez total de las uvas verdes.

Muestra	% Acidez
<b>Blanco</b>	1.08
<b>Comercial</b>	1.92
<b>Q/G</b>	0.8
<b>Q/Se</b>	0.7
<b>Q/PVA</b>	0.57
<b>Q/PVA/Se</b>	0.64

### 5.3.17 Sólidos totales solubles (TSS)

La tabla 32 describe para cada muestra el índice de refracción, los grados Brix y el índice de madurez obtenidos durante la prueba en uvas verdes. La uva verde debe tener en promedio 20 Brix para su óptimo consumo. Entre mayor sea el índice de grados Brix, mayor será la madurez de la fruta. La muestra Q/Se obtuvo el mejor resultado con 30 Brix y en segundo lugar la muestra Q/PVA con 41 Brix, si se compara con la muestra que estuvo recubierta con la película comercial de polipropileno la cual obtuvo 20 Brix, es alto, pero se tiene que tomar en cuenta que las películas plásticas a base de biopolímeros tienen cierta permeabilidad y la humedad traspasa a través de ellas, dejando que se oxiden más rápido y por consiguiente madurar con mayor velocidad.

Este comportamiento se atribuye al incremento del proceso de respiración de la uva, el cual aumenta la hidrólisis de carbohidratos a azúcares, por lo que la cantidad de sólidos totales solubles indica la cantidad de azúcar acumulada durante el proceso de maduración [16]. Cuando la uva comienza a degradarse el TTS incrementa debido al rompimiento y descomposición de las cadenas de los carbohidratos especialmente el almidón a azúcares, por lo que el contenido de estos aumenta considerablemente para ser utilizado como sustrato para la respiración y producir energía [198].

**Tabla 31:** Grados Brix e índice de madurez de las uvas verdes.

Muestra	Índice de Refracción	%Brix	Índice de Madurez
<i>Blanco</i>	1.4133	47	43.51
<i>Comercial</i>	1.3695	23	11.97
<i>Q/G</i>	1.3847	32	40
<i>Q/Se</i>	1.3811	30	42.85
<i>Q/PVA</i>	1.3929	36	63.15
<i>Q/PVA/Se</i>	1.4007	41	64.06

# CAPITULO 6 CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

---

## 6.1 Las conclusiones por fase del proyecto

### **Fase 1: Extracción del biopolímero de exoesqueletos de camarón de la especie *F. Californiensis*:**

- La muestra de quitosano extraído con mejores propiedades para aplicaciones en el desarrollo de películas plásticas para frutas, fue Q/2h, la cual fue sometida al proceso de desacetilación de 2 horas. Teniendo un peso molecular de  $1.26 \times 10^5$  g/mol, un rendimiento del 18.6% a partir de la materia prima, una pureza de 99.78%, un grado de desacetilación de 83.72% y una morfología lisa y con poca porosidad debido al proceso químico de extracción, que, en comparativa con las otras muestras, se encuentra en el rango de quitosano de bajo peso molecular comercial, para uso en elaboración de películas plásticas.

### **Fase 2: Síntesis verde de SeNPS con extracto acuoso de *P. Sericea*:**

- El extracto acuoso de *P. Sericea* contiene los fitocompuestos fenoles, flavonoides, cumarinas y taninos que fungen como reductores y estabilizantes en la síntesis de SeNPs, de acuerdo al análisis FTIR.
- Las SeNPs sintetizadas tienen un tamaño promedio de 52.7 nm, un potencial Z de 43.5 mV y una polaridad negativa, con una morfología esférica, así como una buena actividad antibacteriana ante *E. coli* con 17.5 mm promedio de halo de inhibición, y 9.53 mm de promedio de halo de inhibición ante *S. aureus* por lo que el método empleado es factible y óptimo para su síntesis en aplicaciones para funcionalizar películas plásticas a base de biopolímeros y potencializar sus propiedades ante patógenos.

### Fase 3: Desarrollo de películas plásticas.

- La muestra Q/PVA/Se es la más viable para futuras aplicaciones y desarrollo como película plástica para frutas, en este caso la uva verde, ya que en comparativa con las otras películas esta tiene una mejor apariencia visual con su transparencia, un espesor promedio de 0.2 mm, una densidad aparente de 0.764 g/cm<sup>2</sup>, lo que indica que cuenta con una porosidad baja, menor permeabilidad y una buena actividad antibacteriana. El contenido de humedad MC% es del 47.24%, lo que indica que guarda la humedad de la fruta de manera uniforme, en comparativa con las otras muestras que contienen un menor porcentaje. El grado de hinchabilidad SP% es del 75.55%, indicando su buena capacidad de retención de humedad de la fruta, ya que comparándola con las muestras Q y Q/Se que tienen capacidad nula, por lo que se comprueba que al añadir PVA se aumenta esta propiedad.
- En cuanto a la solubilidad, la muestra elegida tiene un 41.35%, siendo el menor porcentaje entre todas las muestras, lo que da como resultado una película más estable ante la humedad sin degradarse tan rápido.
- La morfología según SEM mostro homogeneidad en la superficie haciéndola lisa y con poca rugosidad, lo que indica una buena miscibilidad entre sus componentes, esto se confirmó de nuevo por AFM, demostrando una vez más que la superficie es lisa y poco rugosa, además de ver la completa miscibilidad de las SeNPs en la película plástica.
- Se comprobó una vez más por medio de FTIR que la miscibilidad de quitosano y PVA fue optimo y con buena reticulación en el pico 848 cm<sup>-1</sup>.
- Las propiedades térmicas de la muestra reafirman una vez más la formación de puentes de hidrogeno en el proceso de reticulación al tener una pérdida de peso menor que las muestras que solo contienen quitosano. Y de acuerdo al análisis DSC la Tg de la película plástica es óptima con 265 C.
- Las propiedades mecánicas de la muestra elegida, arrojan resultados positivos, con un esfuerzo de tracción de 1.5 Mpa, (siendo el mayor de todos) un alargamiento a la rotura del 68.87%, que, aunque fue menor a los demás, está en

el rango de calidad para aplicarlo como película, y un módulo de Young promedio de 4.05 Mpa.

- El mecanismo antibacteriano de la película plástica es óptimo, teniendo mejores resultados para la bacteria *E. coli* con un diámetro de inhibición promedio de 25.6 mm, siendo el mayor entre todas las muestras, y 28.6 mm para *S. aureus*.
- La biodegradabilidad en la tierra fue exitosa, degradándose por completo después de 15 días.
- En aplicación en uva verde, la muestra Q/PVA/Se, mostró mejores resultados que las demás en comparativa de apariencia y degradabilidad de esta y de la fruta, ya que tuvo una mayor protección en la uva por su buena retención de humedad y baja permeabilidad, las uvas tuvieron una pérdida de peso de 35.41%, una acidez del 0.65% que es mucho más baja que la muestra que estuvo en contacto con una película de PP y que tuvo una acidez del 1.92%. Finalmente la madurez de la fruta alcanzo el 64.06%, que, aunque fue la que obtuvo mayor madurez que la muestra Q manteniendo la película intacta.

## **6.2 Conclusión general:**

La utilización de películas plásticas a base de biopolímeros funcionalizadas con NPs es una opción viable para la protección de frutas en toda su vida hasta llegar a manos del consumidor.

## **6.3 Trabajo a futuro:**

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en cada una de las fases en este trabajo de investigación, se propone continuar con las siguientes actividades, para la optimización y continuidad de este proyecto:

*Fase 1: Extracción del biopolímero de exoesqueletos de camarón de la especie F. Californiensis:*

- Realizar la extracción de Q de esta especie utilizando método de reflujo, para corroborar que el rendimiento sea mayor.
- Calcular el peso molecular del Q por otras técnicas de caracterización como la cromatografía de permeación en gel ya que es más precisa y rápida que la viscosimetría capilar.
- Para determinar la pureza y contenido de compuestos en el quitosano, se recomienda la técnica de resonancia magnética nuclear (MNR).
- Calcular la cristalinidad del quitosano por medio de la técnica de Difracción de Rayos X (XRD).

*Fase 2: Síntesis verde de SeNPs con extracto acuoso de P. Sericea:*

- Utilizar otras técnicas de caracterización para SeNps espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), XRD, microscopía electrónica de transmisión (TEM), entre otros. Para brindar un análisis más completo de las características fisicoquímicas de los nanomateriales.
- Realizar pruebas de citotoxicidad para diferentes líneas de células mamíferas, ya que estos estudios son necesarios pensando en utilizar dichas síntesis para añadirlas a películas plásticas que estarán en contacto directo con la comida que posteriormente será ingerida.

*Fase 3: Desarrollo de películas plásticas.*

- Caracterizar la cristalinidad de las películas plásticas por medio de la técnica de XRD.
- Determinar la permeabilidad de cada una de las películas plásticas por medio de la técnica de permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno.
- Caracterizar la capacidad antioxidante de las películas plásticas.
- Realizar análisis antibacterianos para otro tipo de bacterias presentes en alimentos. Análisis antifúngicos para hongos comunes en frutas y verduras.
- Aplicar las películas plásticas en otras frutas y verduras.

## REFERENCIAS:

1. Kaza, S., Yao, L. C., Bhada-Tata, P., & Van Woerden, F. (2018). *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. Washington, DC: World Bank. <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1329-0>
2. Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales. (2020). *Informe de Medio Ambiente. Capítulo 7 Residuos* (Gubernamental 18). Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales. <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/tema/cap7.html#tema0>
3. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2020). *Diagnóstico Básico para la Gestión Integral de los Residuos*. Lucart Estudio S.A. de C.V. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/554385/DBGIR-15-mayo-2020.pdf>
4. Gholap, A. D., Sawant, S. D., Sayyad, S. F., Hatvate, N. T., Chavan, M., Rojekar, S., & Faiyazuddin, M. (2023). Food Biopackaging for Human Benefits: Status and Perspectives. In S. Ahmed (Ed.), *Biobased Packaging Materials* (pp. 1–35). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-6050-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-99-6050-7_1)
5. Flórez, M., Guerra-Rodríguez, E., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022). Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloids*, 124, 107328. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107328>
6. Rafique, A., Mahmood Zia, K., Zuber, M., Tabasum, S., & Rehman, S. (2016). Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.035>
7. Ediyilyam, S., George, B., Shankar, S. S., Dennis, T. T., Waclawek, S., Černík, M., & Padil, V. V. T. (2021). Chitosan/Gelatin/Silver Nanoparticles Composites Films for Biodegradable Food Packaging Applications. *Polymers*, 13(11), 1680. <https://doi.org/10.3390/polym13111680>
8. Ahmed, S., & Ikram, S. (2016). Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023>

9. Liu, B., Ye, H., Liang, Q., Jiang, L., Chen, M., & Yang, S. (2023). Development and characterization of pectin and chitosan films incorporated with a new cross-linking agent. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *103*(4), 1964–1973. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12395>
10. Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A., & Nag, D. (2005). Chitosan–starch composite film: Preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, *21*(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.03.002>
11. Yang, J., Kwon, G.-J., Hwang, K., & Kim, D.-Y. (2018). Cellulose–Chitosan Antibacterial Composite Films Prepared from LiBr Solution. *Polymers*, *10*(10), 1058. <https://doi.org/10.3390/polym10101058>
12. Valizadeh, S., Naseri, M., Babaei, S., Hosseini, S. M. H., & Imani, A. (2019). Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.071>
13. Olewnik-Kruszkowska, E., Gierszewska, M., Jakubowska, E., Tarach, I., Sedlarik, V., & Pummerova, M. (2019). Antibacterial Films Based on PVA and PVA–Chitosan Modified with Poly(Hexamethylene Guanidine). *Polymers*, *11*(12), 2093. <https://doi.org/10.3390/polym11122093>
14. Yan, J., Li, M., Wang, H., Lian, X., Fan, Y., Xie, Z., Niu, B., & Li, W. (2021). Preparation and property studies of chitosan-PVA biodegradable antibacterial multilayer films doped with Cu<sub>2</sub>O and nano-chitosan composites. *Food Control*, *126*, 108049. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108049>
15. Lo'ay, A. A., & Dawood, H. D. (2017). Active chitosan/PVA with ascorbic acid and berry quality of 'Superior seedless' grapes. *Scientia Horticulturae*, *224*, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.043>
16. Coneo, N., Ramos, Y., De Ávila, G., Herrera, A., & Cremades, A. (2023). Active chitosan- poly (vinyl alcohol) film reinforced with zinc oxide nanoparticles for food packaging applications. *Polymers from Renewable Resources*, *14*(3), 173–194. <https://doi.org/10.1177/20412479231174442>

17. Zambonino, M. C., Quizhpe, E. M., Jaramillo, F. E., Rahman, A., Santiago Vispo, N., Jeffryes, C., & Dahoumane, S. A. (2021). Green Synthesis of Selenium and Tellurium Nanoparticles: Current Trends, Biological Properties and Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 989. <https://doi.org/10.3390/ijms22030989>
18. Deepa, T., Mohan, S., & Manimaran, P. (2022). A crucial role of selenium nanoparticles for future perspectives. *Results in Chemistry*, 4, 100367. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100367>
19. Ndwandwe, B. K., Malinga, S. P., Kayitesi, E., & Dlamini, B. C. (2021). Advances in green synthesis of selenium nanoparticles and their application in food packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(6), 2640–2650. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14916>
20. Meenambigai, K., Kokila, R., Chandhirasekar, K., Thendralmanikandan, A., Kaliannan, D., Ibrahim, K. S., Kumar, S., Liu, W., Balasubramanian, B., & Nareshkumar, A. (2022). Green Synthesis of Selenium Nanoparticles Mediated by Nilgiranthus ciliates Leaf Extracts for Antimicrobial Activity on Foodborne Pathogenic Microbes and Pesticidal Activity Against *Aedes aegypti* with Molecular Docking. *Biological Trace Element Research*, 200(6), 2948–2962. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02868-y>
21. Menazea, A. A., Ismail, A. M., Awwad, N. S., & Ibrahim, H. A. (2020). Physical characterization and antibacterial activity of PVA/Chitosan matrix doped by selenium nanoparticles prepared via one-pot laser ablation route. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(5), 9598–9606. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.06.077>
22. Ndwandwe, B. K., Malinga, S. P., Kayitesi, E., & Dlamini, B. C. (2022). Selenium nanoparticles–enhanced potato starch film for active food packaging application. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(10), 6512–6521. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15990>
23. *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales* (Quinta edición). (2014). McGraw-Hill Interamericana Editores.

24. Hermida, Elida. (n.d.). *Polimeros* (1st ed.). Ministerio de educacion, Instituto nacional de educacion tecnologica. [https://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/09\\_Polimeros.pdf](https://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/09_Polimeros.pdf)
25. Rajeswari, S. (2017). NATURAL POLYMERS: A RECENT REVIEW. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 472–494. <https://doi.org/10.20959/wjpps20178-9762>
26. Thomas, S., Sravanthi, L., & Jacob, J. (Eds.). (2020). *Chitin-and chitosan-based biocomposites for food packaging applications*. CRC Press.
27. Lisitsyn, A., Semenova, A., Nasonova, V., Polishchuk, E., Revutskaya, N., Kozyrev, I., & Kotenkova, E. (2021). Approaches in Animal Proteins and Natural Polysaccharides Application for Food Packaging: Edible Film Production and Quality Estimation. *Polymers*, 13(10), 1592. <https://doi.org/10.3390/polym13101592>
28. Jabeen, N., & Atif, M. (2024). Polysaccharides based biopolymers for biomedical applications: A review. *Polymers for Advanced Technologies*, 35(1), e6203. <https://doi.org/10.1002/pat.6203>
29. CRINI, G. (2022). *CHITIN AND CHITOSAN: Discoveries and applications for sustainability*. ELSEVIER ACADEMIC PRESS.
30. Muzzarelli, R. A. A. (1977). *Chitin*. Elsevier Science. <http://qut.ebib.com.au/patron/FullRecord.aspx?p=1817491>
31. Wong-Miramontes I.M., Valdez-Salas B., Beltran-Partida E., Salvador-Carlos J.S., Coronado-Ortega M.A., Curiel-Alvarez M.A. (2024). Chitin and chitosan as versatile polymers: Extraction, characterization and applications in the food packaging sector. In *Biomass, The Novel green gold, Current trends and future uses of biomass resources*. Nova Science Publishers.
32. Peniche, C., Argüelles-Monal, W., & Goycoolea, F. M. (2008). Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. In *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (pp. 517–542). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00025-9>
33. Santos, V. P., Marques, N. S. S., Maia, P. C. S. V., Lima, M. A. B. de, Franco, L. de O., & Campos-Takaki, G. M. de. (2020). Seafood Waste as Attractive Source of

- Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), E4290. <https://doi.org/10.3390/ijms21124290>
34. Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
35. Davis, S. P. (Ed.). (2011). *Chitosan: Manufacture, properties, and usage*. Nova Science Publishers.
36. Mohammad El-Aidie, S. A.-A. (2018). A REVIEW ON CHITOSAN: ECOFRIENDLY MULTIPLE POTENTIAL APPLICATIONS IN THE FOOD INDUSTRY. *International Journal of Advancement in Life Sciences Research*, 1(1), 1–14. <https://doi.org/10.31632/ijalsr.2018v01i01.001>
37. Dong, Q., Qiu, W., Feng, Y., Jin, Y., Deng, S., Tao, N., & Jin, Y. (2023). Proteases and microwave treatment on the quality of chitin and chitosan produced from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *eFood*, 4(2), e73. <https://doi.org/10.1002/efd2.73>
38. Vilar Junior, J. C., Ribeaux, D. R., Alves Da Silva, C. A., & De Campos-Takaki, G. M. (2016). Physicochemical and Antibacterial Properties of Chitosan Extracted from Waste Shrimp Shells. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/5127515>
39. Rosenboom, J.-G., Langer, R., & Traverso, G. (2022). Bioplastics for a circular economy. *Nature Reviews Materials*, 7(2), 117–137. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>
40. Biswas, M. C., Jony, B., Nandy, P. K., Chowdhury, R. A., Halder, S., Kumar, D., Ramakrishna, S., Hassan, M., Ahsan, M. A., Hoque, M. E., & Imam, M. A. (2022). Recent Advancement of Biopolymers and Their Potential Biomedical Applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(1), 51–74. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02199-y>
41. Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International Journal of Advanced Research*, 4(3), 411–427.

42. Mohan, K., Ganesan, A. R., Muralisankar, T., Jayakumar, R., Sathishkumar, P., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., & Revathi, N. (2020). Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in Food Science & Technology*, *105*, 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.016>
43. Joseph, S. M., Krishnamoorthy, S., Paranthaman, R., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2021). A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *2*, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100036>
44. Rasweefali, M. K., Sabu, S., Muhammed Azad, K. S., Raseel Rahman, M. K., Sunooj, K. V., Sasidharan, A., & Anoop, K. K. (2022). Influence of deproteinization and demineralization process sequences on the physicochemical and structural characteristics of chitin isolated from Deep-sea mud shrimp (*Solenocera hextii*). *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, *4*, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.abst.2022.03.001>
45. Lopez y Galvez, M. D., & Rigoberto. (n.d.). *Plan maestro de camaron de altamar del estado de sinaloa*.
46. Barbosa–Saldaña M.L., Díaz–Jaimes P., & Uribe–Alcocer M. (2012). *Variación morfológica del camarón café (Farfantepenaeus californiensis) en el Pacífico mexicano*. *83*(1). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-34532012000100006](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532012000100006)
47. Martinez-Robinson, K. G., Martínez-Inzunza, A., Rochín-Wong, S., Rodríguez Córdova, R. J., Vasquez-Garcia, S. R., & Fernández-Quiroz, D. (2022). Physicochemical study of chitin and chitosan obtained from California brown shrimp (*Farfantepenaeus californiensis*) exoskeleton. *Biocencia*, *24*(2), 28–35. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v24i2.1616>
48. Arnold, N. D., Brück, W. M., Garbe, D., & Brück, T. B. (2020). Enzymatic Modification of Native Chitin and Conversion to Specialty Chemical Products. *Marine Drugs*, *18*(2), 93. <https://doi.org/10.3390/md18020093>

49. Ahmed, S., & Ikram, S. (Eds.). (2017). *Chitosan: Derivatives, composites and applications*. Wiley.
50. Leen Bastiaens, Lise Soetemans, & Els D'Hondt. (2020). Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation. In *Chitin and Chitosan: Properties and Applications* (1st ed.). Wiley.
51. Kumari, S., & Kishor, R. (2020). Chitin and chitosan: Origin, properties, and applications. In *Handbook of Chitin and Chitosan* (pp. 1–33). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817970-3.00001-8>
52. El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181–1189.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>
53. AOAC Official Methods of analysis. (2000). USA: Maryland.
54. Mondragon Cortez Pedro. (2017). *Espectroscopia infrarroja para todos* (1st ed.). CIATEJ. [https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion\\_5a43b7c09fdc1.pdf](https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf)
55. Guía sobre microscopía FT-IR. (n.d.). [Bruker]. *Fundamentos de la microscopía FT-IR*. <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-microscopes/what-is-ft-ir-microscopy.html>
56. Escobar-Barrios V.A., Rangel-Mendez J.R., Andrade-Espinoza G., & Davila-Rodriguez J.L. (2012). FTIR – An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. In *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology* (1st ed., pp. 195–212). IntechOpen.  
<https://www.intechopen.com/books/1591>
57. Pillai, C. K. S., P. Willi, Sharma P.C. (2011). Chitosan: Manufacture, Properties and uses. In *Chitosan, Manufacture, properties and usage*. (1st ed., pp. 133–215). Nova Science Publishers.
58. Weska, R. F., Moura, J. M., Batista, L. M., Rizzi, J., & Pinto, L. A. A. (2007). Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 749–753. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.006>

59. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, *42*(8), 3569–3580. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
60. Yen, M.-T., Yang, J.-H., & Mau, J.-L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, *75*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.06.006>
61. Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*, *13*(4), 1819–1846. <https://doi.org/10.3390/md13041819>
62. Escobar-Sierra D.M, Castro-Ramirez A.M., & Vergara-Castrillo N.A. (2013). *Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan*. *18*(1), 73–88.
63. Thomas, S., Pius, A., & Gopi, S. (2020). *Handbook of chitin and chitosan. Volume 1, Volume 1,*.
64. Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, P. K. (2008). Chitosan based antimicrobial films for food packaging applications. *E-Polymers*, *8*(1). <https://doi.org/10.1515/epoly.2008.8.1.1082>
65. Faraldos, M., & Goberna, C. (Eds.). (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (Segunda edición). Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
66. Dolez Patricia I. (2015). Nanomaterials, definitions, classifications, and applications. In *Nanoengineering global approaches to health and safety issues* (1st ed., Vol. 1). Elsevier Science. [https://www.researchgate.net/profile/Darren-Moss-2/publication/282740152\\_The\\_Application\\_of\\_Nanotechnology\\_to\\_Drug\\_Delivery\\_in\\_Medicine/links/577ce32f08ae355e74f2c878/The-Application-of-Nanotechnology-to-Drug-Delivery-in-Medicine.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Darren-Moss-2/publication/282740152_The_Application_of_Nanotechnology_to_Drug_Delivery_in_Medicine/links/577ce32f08ae355e74f2c878/The-Application-of-Nanotechnology-to-Drug-Delivery-in-Medicine.pdf)
67. Sudha, P. N., Sangeetha, K., Vijayalakshmi, K., & Barhoum, A. (2018). Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. In *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures* (pp. 341–384). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51254-1.00012-9>

68. Mekuye, B., & Abera, B. (2023). Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select*, 4(8), 486–501. <https://doi.org/10.1002/nano.202300038>
69. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
70. Ganachari, S. V., Banapurmath, N. R., Salimath, B., Yaradoddi, J. S., Shettar, A. S., Hunashyal, A. M., Venkataraman, A., Patil, P., Shoba, H., & Hiremath, G. B. (2019). Synthesis Techniques for Preparation of Nanomaterials. In L. M. T. Martínez, O. V. Kharissova, & B. I. Kharisov (Eds.), *Handbook of Ecomaterials* (pp. 83–103). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6\\_149](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6_149)
71. Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., & Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (pp. 303–319). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>
72. Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>
73. Quevedo, A. C., Guggenheim, E., Briffa, S. M., Adams, J., Lofts, S., Kwak, M., Lee, T. G., Johnston, C., Wagner, S., Holbrook, T. R., Hachenberger, Y. U., Tentschert, J., Davidson, N., & Valsami-Jones, E. (2021). UV-Vis Spectroscopic Characterization of Nanomaterials in Aqueous Media. *Journal of Visualized Experiments*, 176, 61764. <https://doi.org/10.3791/61764>
74. Nanocomposix. (2012). *UV/VIS/IR Spectroscopy Analysis of Nanoparticles*. <http://50.87.149.212/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20UV-vis%20Analysis.pdf>
75. Paredes, A. M. (2014). MICROSCOPY | Scanning Electron Microscopy. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 693–701). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00215-9>

76. Guerrero Correa, M., Martínez, F. B., Vidal, C. P., Streitt, C., Escrig, J., & De Dicastillo, C. L. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: A review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *11*, 1450–1469. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129>
77. Singh, H., Desimone, M. F., Pandya, S., Jasani, S., George, N., Adnan, M., Aldarhami, A., Bazaid, A. S., & Alderhami, S. A. (2023). Revisiting the Green Synthesis of Nanoparticles: Uncovering Influences of Plant Extracts as Reducing Agents for Enhanced Synthesis Efficiency and Its Biomedical Applications. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 18*, 4727–4750. <https://doi.org/10.2147/IJN.S419369>
78. Malik, A. Q., Mir, T. U. G., Kumar, D., Mir, I. A., Rashid, A., Ayoub, M., & Shukla, S. (2023). A review on the green synthesis of nanoparticles, their biological applications, and photocatalytic efficiency against environmental toxins. *Environmental Science and Pollution Research*, *30(27)*, 69796–69823. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27437-9>
79. Villaseñor, J. L., & Villa Real, J. Á. (2006). El género *Pluchea* (familia Asteraceae, tribu Plucheeae) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *77(001)*. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2006.001.318>
80. Luck Montero, R., Avendaño Reyes, L., Ail Catzim, C. E., Cuéllar Ordaz, J., Muñoz Tenería, F., & Macías Cruz, U. (2018). Actividad ovicida y larvicida de extractos acuosos de *Pluchea sericea* y *Artemisia tridentata* en *Haemonchus contortus*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, *5(13)*, 149–156. <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1370>
81. ICBC. (n.d.). Cachanilla. In *Diccionario enciclopedia de Baja California*. <https://www.bajacalifornia.gob.mx/Cultura/Secciones/DiccionarioBC>
82. Camacho-Escobar, M. A., Ramos-Ramos, D. A., Ávila-Serrano, N. Y., Sánchez-Bernal, E. I., & López-Garrido, S. J. (2020). Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, *38(2)*, 443–453. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.629>
83. Ebguna C., Ifemeje J., Kryeziu T., Mukherjee M., Shah H., Narashimha R., Francis L.J., & Tijjani H. (2019). Introduction to Phytochemistry. In *Phytochemistry*

- Fundamentals, Modern Techniques and applications* (1st ed., Vol. 1). Taylor and Francis.
84. Banjo T.T., Akinduti P.A., Banjo T.O., & Kumar B. (2019). Phytochemical Extraction, Isolation and detection Techniques. In *Phytochemistry, Fundamentals, Modern Techniques and Applications* (1st ed., Vol. 1, pp. 247–260). Apple Academic Press, Inc.
85. Vishnu Balamurugan, Sheerin Fatima.M.A, & Sreenithi Velurajan. (2019). *A GUIDE TO PHYTOCHEMICAL ANALYSIS*. 5(1), 237–245.
86. Nortjie, E., Basitere, M., Moyo, D., & Nyamukamba, P. (2022). Extraction Methods, Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Textiles: A Review. *Plants*, 11(15), 2011.  
<https://doi.org/10.3390/plants11152011>
87. Harborne, J. B. (1980). *Phytochemical Methods*. Springer Netherlands.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7>
88. Michalke, B. (Ed.). (2018). *Selenium*. Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-95390-8>
89. Souza, L. M. D. S., Dibo, M., Sarmiento, J. J. P., Seabra, A. B., Medeiros, L. P., Lourenço, I. M., Kobayashi, R. K. T., & Nakazato, G. (2022). Biosynthesis of selenium nanoparticles using combinations of plant extracts and their antibacterial activity. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100303. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100303>
90. Hassan, H. U., Raja, N. I., Abasi, F., Mehmood, A., Qureshi, R., Manzoor, Z., Shahbaz, M., & Proćków, J. (2022). Comparative Study of Antimicrobial and Antioxidant Potential of *Olea ferruginea* Fruit Extract and Its Mediated Selenium Nanoparticles. *Molecules*, 27(16), 5194.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27165194>
91. Bisht, N., Phalswal, P., & Khanna, P. K. (2022). Selenium nanoparticles: A review on synthesis and biomedical applications. *Materials Advances*, 3(3), 1415–1431.  
<https://doi.org/10.1039/D1MA00639H>

92. Ao, B., Du, Q., Liu, D., Shi, X., Tu, J., & Xia, X. (2023). A review on synthesis and antibacterial potential of bio-selenium nanoparticles in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1229838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1229838>
93. Huang, Y., Chen, Q., Zeng, H., Yang, C., Wang, G., & Zhou, L. (2023). A Review of Selenium (Se) Nanoparticles: From Synthesis to Applications. *Particle & Particle Systems Characterization*, *40*(11), 2300098. <https://doi.org/10.1002/ppsc.202300098>
94. Sentkowska, A., & Pyrzyńska, K. (2019). Investigation of antioxidant activity of selenium compounds and their mixtures with tea polyphenols. *Molecular Biology Reports*, *46*(3), 3019–3024. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04738-2>
95. Vera, P., Canellas, E., & Nerín, C. (2018). New Antioxidant Multilayer Packaging with Nanoselenium to Enhance the Shelf-Life of Market Food Products. *Nanomaterials*, *8*(10), 837. <https://doi.org/10.3390/nano8100837>
96. Hussain, A., Lakhan, M. N., Hanan, A., Soomro, I. A., Ahmed, M., Bibi, F., & Zehra, I. (2023). Recent progress on green synthesis of selenium nanoparticles – a review. *Materials Today Sustainability*, *23*, 100420. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2023.100420>
97. Hong, L. G., Yuhana, N. Y., Zawawi, E. Z. E., Department of Chemical and Process Engineering, Faculty of Engineering & Built Environment, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Malaysia, Research Center for Sustainable Process Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia, & Faculty of Applied Sciences, Universiti Teknologi MARA, 40450 Shah Alam, Selangor, Malaysia. (2021). Review of bioplastics as food packaging materials. *AIMS Materials Science*, *8*(2), 166–184. <https://doi.org/10.3934/matensci.2021012>
98. Shlush, E., & Davidovich-Pinhas, M. (2022). Bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, *125*, 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.026>
99. Jabeen, N., Majid, I., & Nayik, G. A. (2015). Bioplastics and food packaging: A review. *Cogent Food & Agriculture*, *1*(1), 1117749. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1117749>

100. Popović, S. Z., Lazić, V. L., Hromiš, N. M., Šuput, D. Z., & Bulut, S. N. (2018). Biopolymer Packaging Materials for Food Shelf-Life Prolongation. In *Biopolymers for Food Design* (pp. 223–277). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00008-6>
101. Asgher, M., Qamar, S. A., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2020). Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Research International*, *137*, 109625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109625>
102. Adeyeye, O. A., Sadiku, E. R., Babu Reddy, A., Ndamase, A. S., Makgatho, G., Sellamuthu, P. S., Perumal, A. B., Nambiar, R. B., Fasiku, V. O., Ibrahim, I. D., Agboola, O., Kupolati, W. K., Daramola, O. O., Machane, M. J., & Jamiru, T. (2019). The Use of Biopolymers in Food Packaging. In D. Gnanasekaran (Ed.), *Green Biopolymers and their Nanocomposites* (pp. 137–158). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8063-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8063-1_6)
103. Rhim, J.-W., & Ng, P. K. W. (2007). Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(4), 411–433. <https://doi.org/10.1080/10408390600846366>
104. Fitriani, F., Bilad, M. R., Aprilia, S., & Arahman, N. (2023). Biodegradable Hybrid Polymer Film for Packaging: A Review. *Journal of Natural Fibers*, *20*(1), 2159606. <https://doi.org/10.1080/15440478.2022.2159606>
105. González-López, M. E., Calva-Estrada, S. D. J., Gradilla-Hernández, M. S., & Barajas-Álvarez, P. (2023). Current trends in biopolymers for food packaging: A review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *7*, 1225371. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1225371>
106. Khalid, M. Y., & Arif, Z. U. (2022). Novel biopolymer-based sustainable composites for food packaging applications: A narrative review. *Food Packaging and Shelf Life*, *33*, 100892. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100892>
107. Pavlath, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 1–23). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1)

108. Abdullah, Cai, J., Hafeez, M. A., Wang, Q., Farooq, S., Huang, Q., Tian, W., & Xiao, J. (2022). Biopolymer-based functional films for packaging applications: A review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1000116. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1000116>
109. Fredi, G., & Dorigato, A. (2023). Compatibilization of biopolymer blends: A review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, S2542504823000738. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2023.11.002>
110. Westlake, J. R., Tran, M. W., Jiang, Y., Zhang, X., Burrows, A. D., & Xie, M. (2023). Biodegradable biopolymers for active packaging: Demand, development and directions. *Sustainable Food Technology*, 1(1), 50–72. <https://doi.org/10.1039/D2FB00004K>
111. Spirk, S., Palasingh, C., & Nypelö, T. (2021). Current Opportunities and Challenges in Biopolymer Thin Film Analysis—Determination of Film Thickness. *Frontiers in Chemical Engineering*, 3, 755446. <https://doi.org/10.3389/fceng.2021.755446>
112. Zaher, K., El Kolli, M., Riahi, F., & Doufnoune, R. (2009). Preparation and Characterization of Hydrocolloid Biopolymer-Based Films for Dressing Applications. *International Journal of Polymeric Materials*, 58(12), 665–680. <https://doi.org/10.1080/00914030903146738>
113. Chang R. (2013). *Quimica* (10th ed., Vol. 1). McGraw-Hill.
114. Onovo, H. O., Akano, T. T., Onyegbule, D. U., Towolawi, E. T., & Ajala, T. S. (2022). A Study of Biodegradation of Hybrid Bioplastic Films Blend from Manihot and Triticum Biopolymer. *European Journal of Engineering and Technology Research*, 7(3), 30–38. <https://doi.org/10.24018/ejeng.2022.7.3.2772>
115. Lozano-Navarro, J., Díaz-Zavala, N., Velasco-Santos, C., Melo-Banda, J., Páramo-García, U., Paraguay-Delgado, F., García-Alamilla, R., Martínez-Hernández, A., & Zapién-Castillo, S. (2018). Chitosan-Starch Films with Natural Extracts: Physical, Chemical, Morphological and Thermal Properties. *Materials*, 11(1), 120. <https://doi.org/10.3390/ma11010120>
116. Singh, T. P., Chatli, M. K., & Sahoo, J. (2015). Development of chitosan based edible films: Process optimization using response surface methodology. *Journal*

- of Food Science and Technology*, 52(5), 2530–2543.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1318-6>
117. Tomoda, B. T., Yassue-Cordeiro, P. H., Ernesto, J. V., Lopes, P. S., Péres, L. O., Da Silva, C. F., & De Moraes, M. A. (2020). Characterization of biopolymer membranes and films: Physicochemical, mechanical, barrier, and biological properties. In *Biopolymer Membranes and Films* (pp. 67–95). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818134-8.00003-1>
118. Baron, R. D., Pérez, L. L., Salcedo, J. M., Córdoba, L. P., & Sobral, P. J. D. A. (2017). Production and characterization of films based on blends of chitosan from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste and pectin from Orange (*Citrus sinensis* Osbeck) peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 676–683.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.004>
119. Yadav, M., Behera, K., Chang, Y.-H., & Chiu, F.-C. (2020). Cellulose Nanocrystal Reinforced Chitosan Based UV Barrier Composite Films for Sustainable Packaging. *Polymers*, 12(1), 202. <https://doi.org/10.3390/polym12010202>
120. Groover, M. P. (2007). *Fundamentals of modern manufacturing: Materials, processes, and systems* (3rd ed). J. Wiley & Sons.
121. Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 477–488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
122. Rinaudo, M., Milas, M., & Dung, P. L. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(5), 281–285.  
[https://doi.org/10.1016/0141-8130\(93\)90027-J](https://doi.org/10.1016/0141-8130(93)90027-J)
123. Chattopadhyay, D. P., & Inamdar, M. S. (2010). Aqueous Behaviour of Chitosan. *International Journal of Polymer Science*, 2010, 1–7.  
<https://doi.org/10.1155/2010/939536>
124. *ASTM D882-18 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting* (18). (2018). <https://www.astm.org/d0882-18.html>

125. Homez-Jara, A., Daza, L. D., Aguirre, D. M., Muñoz, J. A., Solanilla, J. F., & Váquiro, H. A. (2018). Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1233–1240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.057>
126. Pavinatto, A., Pavinatto, F. J., Delezuik, J. A. D. M., Nobre, T. M., Souza, A. L., Campana-Filho, S. P., & Oliveira, O. N. (2013). Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.047>
127. Sigma Aldrich. (2024). *Sigma Aldrich Chitosan Molecular Weight* [Sigma Aldrich]. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/448877>
128. Tian, M., Tan, H., Li, H., & You, C. (2015). Molecular weight dependence of structure and properties of chitosan oligomers. *RSC Advances*, 5(85), 69445–69452. <https://doi.org/10.1039/C5RA08358C>
129. Zheng, K., Xiao, S., Li, W., Wang, W., Chen, H., Yang, F., & Qin, C. (2019). Chitosan-acorn starch-eugenol edible film: Physico-chemical, barrier, antimicrobial, antioxidant and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.151>
130. Dolgopiatova, N., Kuchina, Y., Dyakina, T., & Volkova, T. (2020). Effect of Heterogeneous Deacetylation on the Properties of Northern Shrimp Chitin and Chitosan. *KnE Life Sciences*. <https://doi.org/10.18502/kls.v5i1.6077>
131. Boudouaia, N., Bengharez, Z., & Jellali, S. (2019). Preparation and characterization of chitosan extracted from shrimp shells waste and chitosan film: Application for Eriochrome black T removal from aqueous solutions. *Applied Water Science*, 9(4), 91. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0967-z>
132. Acosta-Ferreira, S., Castillo, O. S., Madera-Santana, J. T., Mendoza-García, D. A., Núñez-Colín, C. A., Grijalva-Verdugo, C., Villa-Lerma, A. G., Morales-Vargas, A. T., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2020). Production and physicochemical characterization of chitosan for the harvesting of wild microalgae consortia. *Biotechnology Reports*, 28, e00554. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00554>

133. Rakshit, S., Mondal, S., Pal, K., Jana, A., Soren, J. P., Barman, P., Mondal, K. C., & Halder, S. K. (2021). Extraction of chitin from *Litopenaeus vannamei* shell and its subsequent characterization: An approach of waste valorization through microbial bioprocessing. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *44*(9), 1943–1956. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02574-y>
134. Hosney, A., Ullah, S., & Barčauskaitė, K. (2022). A Review of the Chemical Extraction of Chitosan from Shrimp Wastes and Prediction of Factors Affecting Chitosan Yield by Using an Artificial Neural Network. *Marine Drugs*, *20*(11), 675. <https://doi.org/10.3390/md20110675>
135. Leo Edward, M., Dharanibalaji, K. C., Kumar, K. T., Chandrabose, A. R. S., Shanmugharaj, A. M., & Jaisankar, V. (2022). Preparation and characterisation of chitosan extracted from shrimp shell (*Penaeus monodon*) and chitosan-based blended solid polymer electrolyte for lithium-ion batteries. *Polymer Bulletin*, *79*(1), 587–604. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03472-1>
136. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Shojaosadati, S. A., Dorkoosh, F. A., & Elsabee, M. Z. (2011). Enhancement and Characterization of Chitosan Extraction from the Wastes of Shrimp Packaging Plants. *Journal of Polymers and the Environment*, *19*(3), 776–783. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0321-5>
137. Parthiban, F., Balasundari, S., Gopalakannan, A., Rathnakumar, K., & Felix, S. (2017). Comparison of the Quality of Chitin and Chitosan from Shrimp, Crab and *Squilla* Waste. *Current World Environment*, *12*(3), 670–677. <https://doi.org/10.12944/CWE.12.3.18>
138. Sarbon, N. M., Sandanamsamy, S., Kamaruzaman, S. F. S., & Ahmad, F. (2015). Chitosan extracted from mud crab (*Scylla olivacea*) shells: Physicochemical and antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(7), 4266–4275. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1522-4>
139. Roberts, G. A. F. (1992). *Chitin Chemistry*. Macmillan Education UK. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-11545-7>
140. Lizardi-Mendoza, J., Argüelles Monal, W. M., & Goycoolea Valencia, F. M. (2016). Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In *Chitosan in*

- the Preservation of Agricultural Commodities* (pp. 3–31). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X>
141. Rodrigues, C., De Mello, J. M. M., Dalcanton, F., Macuvele, D. L. P., Padoin, N., Fiori, M. A., Soares, C., & Riella, H. G. (2020). Mechanical, Thermal and Antimicrobial Properties of Chitosan-Based-Nanocomposite with Potential Applications for Food Packaging. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(4), 1216–1236. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01678-y>
142. Kaya, M., Khadem, S., Cakmak, Y. S., Mujtaba, M., Ilk, S., Akyuz, L., Salaberria, A. M., Labidi, J., Abdulqadir, A. H., & Deligöz, E. (2018). Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *RSC Advances*, 8(8), 3941–3950. <https://doi.org/10.1039/C7RA12070B>
143. Eddy, M., Tbib, B., & EL-Hami, K. (2020). A comparison of chitosan properties after extraction from shrimp shells by diluted and concentrated acids. *Heliyon*, 6(2), e03486. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03486>
144. Ben Seghir, B., & Benhamza, M. H. (2017). Preparation, optimization and characterization of chitosan polymer from shrimp shells. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(3), 1137–1147. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9490-9>
145. Ilyas, H. N., Zia, K. M., Rehman, S., Ilyas, R., & Sultana, S. (2021). Utilization of Shellfish Industrial Waste for Isolation, Purification, and Characterizations of Chitin From Crustacean's Sources in Pakistan. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(7), 2337–2348. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02037-7>
146. Muley, A. B., Chaudhari, S. A., Mulchandani, K. H., & Singhal, R. S. (2018). Extraction and characterization of chitosan from prawn shell waste and its conjugation with cutinase for enhanced thermo-stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.115>
147. Srinivasan, H., Kanayairam, V., & Ravichandran, R. (2018). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer

- cell line, PA-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 662–667. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.035>
148. Öğretmen, Ö. Y., Karsli, B., & Çağlak, E. (2021). Extraction and Physicochemical Characterization of Chitosan from Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) Shell Wastes. *Tarım Bilimleri Dergisi*. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.861909>
149. Borja-Urzola, A. D. C., García-Gómez, R. S., Flores, R., & Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. D. C. (2020). Chitosan from shrimp residues with a saturated solution of calcium chloride in methanol and water. *Carbohydrate Research*, 497, 108116. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108116>
150. Iber, B. T., Torsabo, D., Chik, C. E. N. C. E., Wahab, F., Abdullah, S. R. S., Hassan, H. A., & Kasan, N. A. (2022). The impact of re-ordering the conventional chemical steps on the production and characterization of natural chitosan from biowaste of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Sea Research*, 190, 102306. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2022.102306>
151. El-araby, A., El Ghadraoui, L., & Errachidi, F. (2022). Physicochemical Properties and Functional Characteristics of Ecologically Extracted Shrimp Chitosans with Different Organic Acids during Demineralization Step. *Molecules*, 27(23), 8285. <https://doi.org/10.3390/molecules27238285>
152. Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S., & Poinern, G. (2015). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials*, 8(11), 7278–7308. <https://doi.org/10.3390/ma8115377>
153. Alagesan, V., & Venugopal, S. (2019). Green Synthesis of Selenium Nanoparticle Using Leaves Extract of *Withania somnifera* and Its Biological Applications and Photocatalytic Activities. *BioNanoScience*, 9(1), 105–116. <https://doi.org/10.1007/s12668-018-0566-8>
154. Geoffrion, L. D., Hesabizadeh, T., Medina-Cruz, D., Kusper, M., Taylor, P., Vernet-Crua, A., Chen, J., Ajo, A., Webster, T. J., & Guisbiers, G. (2020). Naked Selenium Nanoparticles for Antibacterial and Anticancer Treatments. *ACS Omega*, 5(6), 2660–2669. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03172>

155. Abhijeet Puri & Swati Patil. (2022). *Tinospora cordifolia* Stem Extract-mediated Green Synthesis of Selenium Nanoparticles and its Biological Applications. *14*(3), 1–8. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.x>
156. Kokila, K., Elavarasan, N., & Sujatha, V. (2017). Diospyros montana leaf extract-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their biological applications. *New Journal of Chemistry*, *41*(15), 7481–7490. <https://doi.org/10.1039/C7NJ01124E>
157. Alghuthaymi, M. A., Diab, A. M., Elzahy, A. F., Mazrou, K. E., Tayel, A. A., & Moussa, S. H. (2021). Green Biosynthesized Selenium Nanoparticles by Cinnamon Extract and Their Antimicrobial Activity and Application as Edible Coatings with Nano-Chitosan. *Journal of Food Quality*, *2021*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/6670709>
158. Yilmaz Atay, H. (2019). Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. In S. Jana & S. Jana (Eds.), *Functional Chitosan* (pp. 457–489). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15)
159. Safdar, M., Aslam, S., Akram, M., Khaliq, A., Ahsan, S., Liaqat, A., Mirza, M., Waqas, M., & Qureshi, W. A. (2023). Bombax ceiba flower extract mediated synthesis of Se nanoparticles for antibacterial activity and urea detection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(3), 80. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03513-z>
160. Lazcano-Ramírez, H. G., Garza-García, J. J. O., Hernández-Díaz, J. A., León-Morales, J. M., Macías-Sandoval, A. S., & García-Morales, S. (2023). Antifungal Activity of Selenium Nanoparticles Obtained by Plant-Mediated Synthesis. *Antibiotics*, *12*(1), 115. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010115>
161. Dhawan, G., Singh, I., Dhawan, U., & Kumar, P. (2021). Synthesis and Characterization of Nanoselenium: A Step-by-Step Guide for Undergraduate Students. *Journal of Chemical Education*, *98*(9), 2982–2989. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01467>
162. Niu, Y. F., Guin, J. P., Chassagnon, R., Smektala, F., Abdelouas, A., Rouxel, T., & Troles, J. (2012). Selenium Nanoparticles Synthesized via a Facile Hydrothermal

- Method. *Advanced Materials Research*, 535–537, 289–292.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.535-537.289>
163. Salem, S. S., Badawy, M. S. E. M., Al-Askar, A. A., Arishi, A. A., Elkady, F. M., & Hashem, A. H. (2022). Green Biosynthesis of Selenium Nanoparticles Using Orange Peel Waste: Characterization, Antibacterial and Antibiofilm Activities against Multidrug-Resistant Bacteria. *Life*, 12(6), 893.  
<https://doi.org/10.3390/life12060893>
164. Ramamurthy, Ch., Sampath, K. S., Arunkumar, P., Kumar, M. S., Sujatha, V., Premkumar, K., & Thirunavukkarasu, C. (2013). Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(8), 1131–1139. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0867-1>
165. Hashem, A. H., & Salem, S. S. (2022). Green and ecofriendly biosynthesis of selenium nanoparticles using *Urtica dioica* (stinging nettle) leaf extract: Antimicrobial and anticancer activity. *Biotechnology Journal*, 17(2), 2100432.  
<https://doi.org/10.1002/biot.202100432>
166. Cittrarasu, V., Kaliannan, D., Dharman, K., Maluventhen, V., Easwaran, M., Liu, W. C., Balasubramanian, B., & Arumugam, M. (2021). Green synthesis of selenium nanoparticles mediated from *Ceropegia bulbosa* Roxb extract and its cytotoxicity, antimicrobial, mosquitocidal and photocatalytic activities. *Scientific Reports*, 11(1), 1032. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80327-9>
167. Srivastava, N., & Mukhopadhyay, M. (2015). Green synthesis and structural characterization of selenium nanoparticles and assessment of their antimicrobial property. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(9), 1723–1730.  
<https://doi.org/10.1007/s00449-015-1413-8>
168. Alam, H., Khatoon, N., Raza, M., Ghosh, P. C., & Sardar, M. (2019). Synthesis and Characterization of Nano Selenium Using Plant Biomolecules and Their Potential Applications. *BioNanoScience*, 9(1), 96–104. <https://doi.org/10.1007/s12668-018-0569-5>

169. Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/827965>
170. Musa Moi, I., Ibrahim, Z., Mohammed Abubakar, B., Mohammed Katagum, Y., Abdullahi, A., Ajibji Yiga, G., Abdullahi, B., Mustapha, I., Ali, J., Mahmud, Z., Maimusa, H., Oge Katagum, H., Muhammad Malami, A., Mustapha, A., & Ayuba, I. (2023). Properties of Foodborne Pathogens and Their Diseases. In A. Lamas, C. Manuel Franco, & P. Regal (Eds.), *Foodborne Pathogens—Recent Advances in Control and Detection*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105694>
171. Ezhuthupurakkal, P. B., Polaki, L. R., Suyavaran, A., Subastri, A., Sujatha, V., & Thirunavukkarasu, C. (2017). Selenium nanoparticles synthesized in aqueous extract of *Allium sativum* perturbs the structural integrity of Calf thymus DNA through intercalation and groove binding. *Materials Science and Engineering: C*, 74, 597–608. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.003>
172. Sani-e-Zahra, Iqbal, M. S., Abbas, K., & Qadir, M. I. (2022). Synthesis, characterization and evaluation of biological properties of selenium nanoparticles from *Solanum lycopersicum*. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(7), 103901. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103901>
173. Ferro, C., Florindo, H. F., & Santos, H. A. (2021). Selenium Nanoparticles for Biomedical Applications: From Development and Characterization to Therapeutics. *Advanced Healthcare Materials*, 10(16), 2100598. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100598>
174. Worku, L. A., Tadesse, M. G., Bachheti, A., Pandey, D. P., Chandel, A. K., Ewuntu, A. W., & Bachheti, R. K. (2024). Experimental investigations on PVA/chitosan and PVA/chitin films for active food packaging using *Oxytenanthera abyssinica* lignin nanoparticles and its UV-shielding, antimicrobial, and antiradical effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127644. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127644>
175. Yang, D., Liu, Q., Gao, Y., Wan, S., Meng, F., Weng, W., & Zhang, Y. (2023). Characterization of silver nanoparticles loaded chitosan/polyvinyl alcohol

- antibacterial films for food packaging. *Food Hydrocolloids*, 136, 108305.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108305>
176. Castelló, M. E., Anbinder, P. S., Amalvy, J. I., & Peruzzo, P. J. (2018). Production and characterization of chitosan and glycerol-chitosan films. *MRS Advances*, 3(61), 3601–3610. <https://doi.org/10.1557/adv.2018.589>
177. Cazón, P., & Vázquez, M. (2020). Mechanical and barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 257–267. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00936-3>
178. De Souza Costa-Júnior, E., Pereira, M. M., & Mansur, H. S. (2009). Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(2), 553–561. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3627-7>
179. Liu, Y., Yuan, Y., Duan, S., Li, C., Hu, B., Liu, A., Wu, D., Cui, H., Lin, L., He, J., & Wu, W. (2020). Preparation and characterization of chitosan films with three kinds of molecular weight for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.217>
180. Khan, M. U. A., Yaqoob, Z., Ansari, M. N. M., Razak, S. I. A., Raza, M. A., Sajjad, A., Haider, S., & Busra, F. M. (2021). Chitosan/Poly Vinyl Alcohol/Graphene Oxide Based pH-Responsive Composite Hydrogel Films: Drug Release, Anti-Microbial and Cell Viability Studies. *Polymers*, 13(18), 3124. <https://doi.org/10.3390/polym13183124>
181. Rachtanapun, P., Klunklin, W., Jantrawut, P., Jantanasakulwong, K., Phimolsiripol, Y., Seesuriyachan, P., Leksawasdi, N., Chaiyaso, T., Ruksiriwanich, W., Phongthai, S., Sommano, S. R., Punyodom, W., Reungsang, A., & Ngo, T. M. P. (2021). Characterization of Chitosan Film Incorporated with Curcumin Extract. *Polymers*, 13(6), 963. <https://doi.org/10.3390/polym13060963>
182. Priyadarshi, R., & Rhim, J.-W. (2020). Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 62, 102346. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102346>

183. Marsh, K., & Bugusu, B. (2007). Food Packaging? Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, 72(3), R39–R55.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
184. Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M. T., & De La Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116(4), 889–899.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>
185. Chen, P., Xie, F., Tang, F., & McNally, T. (2020). Unexpected Plasticization Effects on the Structure and Properties of Polyelectrolyte Complexed Chitosan/Alginate Materials. *ACS Applied Polymer Materials*, 2(7), 2957–2966.  
<https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00433>
186. El-Hefian A., Nasef M., & Yahaya A. (2010). *The Preparation and Characterization of Chitosan / Poly (Vinyl Alcohol) Blended Films*.
187. Annu, Ali, A., & Ahmed, S. (2021). Eco-friendly natural extract loaded antioxidative chitosan/polyvinyl alcohol based active films for food packaging. *Heliyon*, 7(3), e06550. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06550>
188. Maria V, D., Bernal, C., & Francois, N. J. (2016). Development of Biodegradable Films Based on Chitosan/Glycerol Blends Suitable for Biomedical Applications. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 07(03). <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000187>
189. Kasai, D., Chougale, R., Masti, S., Chalannavar, R., Malabadi, R. B., & Gani, R. (2018). Influence of *Syzygium cumini* leaves extract on morphological, thermal, mechanical, and antimicrobial properties of PVA and PVA/chitosan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(17), 46188.  
<https://doi.org/10.1002/app.46188>
190. Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., & Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463–470.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.002>

191. Khouri, J., Penlidis, A., & Moresoli, C. (2019). Viscoelastic Properties of Crosslinked Chitosan Films. *Processes*, 7(3), 157.  
<https://doi.org/10.3390/pr7030157>
192. Kou, S. (Gabriel), Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>
193. Goy, R. C., Morais, S. T. B., & Assis, O. B. G. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 122–127.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.010>
194. Liu, T., Li, J., Tang, Q., Qiu, P., Gou, D., & Zhao, J. (2022). Chitosan-Based Materials: An Overview of Potential Applications in Food Packaging. *Foods*, 11(10), 1490. <https://doi.org/10.3390/foods11101490>
195. M R, S., K M, R., S, B., A B, H., Vishwanath, P. M., Syed, A., Eswaramoorthy, R., Amachawadi, R. G., Shivamallu, C., Chattu, V. K., Majani, S. S., & Kollur, S. P. (2023). Pectin/PVA and pectin-MgO/PVA films: Preparation, characterization and biodegradation studies. *Heliyon*, 9(5), e15792.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15792>
196. Singhaboot, P., Kraisuwan, W., Chatkumpjunjalearn, T., Kroeksakul, P., & Chongkolnee, B. (2023). Development and Characterization of Polyvinyl Alcohol/Bacterial Cellulose Composite for Environmentally Friendly Film. *Journal of Ecological Engineering*, 24(6), 226–238.  
<https://doi.org/10.12911/22998993/162954>
197. Wrońska, N., Katir, N., Nowak-Lange, M., El Kadib, A., & Lisowska, K. (2023). Biodegradable Chitosan-Based Films as an Alternative to Plastic Packaging. *Foods*, 12(18), 3519. <https://doi.org/10.3390/foods12183519>
198. Wati, A. T., & Maharani, E. P. (2020). THE EFFECT OF CHITOSAN COATING ON COLOR AND BRIX OF RED GRAPES (*Vitis vinifera*) IN STORAGE. *Jurnal Teknik Pertanian Lampung (Journal of Agricultural Engineering)*, 9(4), 361.  
<https://doi.org/10.23960/jtep-l.v9i4.361-366>

## CAPITULO VII. ANEXOS

---

### 7.1 Publicaciones

1. Wong-Miramontes I.M., Valdez-Salas B., Beltran-Partida E., Salvador-Carlos J.S., Coronado-Ortega M.A., Curiel-Alvarez M.A. (2024). Chitin and chitosan as versatile polymers: Extraction, characterization and applications in the food packaging sector. In Biomass, The Novel green gold, Current trends and future uses of biomass resources. Nova Science Publishers. ISSN: 0979-8-89113-349-5
2. Wong-Miramontes, I.M.; Valdez-Salas, B.; Beltrán-Partida, E.; Salvador-Carlos, J.; Guillén-Carvajal, K.M.; Castillo-Saenz, J.R.; Moe, P.; Cheng, N. Characterization of *Farfantepenaeus californiensis* Derived Chitosan for Smart-Active Food Packing Applications. Preprints 2024, 2024031000. <https://doi.org/10.20944/preprints202403.1000.v1>

### 7.2 Participaciones en congresos

1. Ivone Michel Wong Miramontes, Benjamin Valdez Salas, “*Chitosan Biopolymer functionalized with selenium nanoparticles, as an antibacterial agent for the food packaging industry*”. Symposium of Nanoscience and Nanomaterials, August 31-September 2<sup>nd</sup>, Ensenada B.C. Mexico.
2. Ivone Michel Wong Miramontes, Benjamín Valdez Salas, “*Green synthesis of selenium nanoparticles using *Pluchea Sericea* (cachanilla) aqueous extract, as an antibacterial agent for the food packaging industry*”. XV International conference on surfaces, materials and vacuum, September 26-29<sup>th</sup> 2022, Puerto Vallarta, Mexico.
3. Ivone Michel Wong Miramontes, Benjamín Valdez Salas, *Síntesis Verde de Nanopartículas de Selenio Utilizando Extracto de la Planta *Pluchea Sericea*, como Agente Antibacterial para la Industria el Empaque Alimenticio*. NanoMXL. Mexicali B.C. a 16 de noviembre del 2022.
4. Ivone Michel Wong-Miramontes MSc<sup>1</sup>, Benjamin Valdez-Salas Dr.<sup>1</sup>, Ernesto Alonso Beltran-Partida Dr. Sesión Oral: “*Chitosan/PVA biopolymer functionalized with selenium nanoparticles, as an antibacterial agent for the food packaging*

*industry” XVI international conference on surfaces, materials and vacuum, September 25-29<sup>th</sup> 2023, Zacatecas, Mexico.*

5. Ivone Michel Wong Miramontes, Benjamín Valdez Salas, *“Green synthesis of selenium nanoparticles using Pluchea Sericea (cachanilla) aqueous extract, as an antibacterial agent”*, Escuela de Nanoespectroscopía, 4-7 diciembre 2023, CDMX, México.
6. Ivone Michel Wong Miramontes, Benjamin Valdez Salas, *“Chitosan Biopolymer functionalized with selenium nanoparticles, as an antibacterial agent for the food packaging industry”*. XXIV Escuela Nacional de Biofísica Molecular, 5-8 diciembre 2023, Hermosillo, Sonora, México.

### **7.3 Estancia de Investigación**

1. Laboratorio de Polímeros Avanzados, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP. 1-30 Julio 2022.
2. 1st Symposium and Summer School, Groningen University- UNAM, “Nanoscience, Biomaterials and Bionanotechnology”, June 19-22, 2023, UNAM, CDMX, Mexico
3. XIX Escuela de Ciencia e Ingeniería de materiales, Instituto de Materiales, CU UNAM, 19-30 junio, CDMX, México.

### **7.4 Participaciones con el proyecto STEAM UABC**

1. Taller: “Hagamos un bioplástico”, *Pabellón de la ciencia STEAM-UABC, I Festival Aeroespacial Mexicali en las Alturas*, 30 abril 2022, Laguna Salada, B.C. México
2. Taller “Hagamos un bioplástico”, Festival de ciencia y arte, Facultad de Pedagogía, Octubre 2022, Mexicali, B.C., México.
3. Taller: “Hagamos un bioplástico”, *Pabellón de la ciencia STEAM-UABC, II Festival Aeroespacial Mexicali en las Alturas*, 26 noviembre 2022, Mexicali, B.C. México
4. Taller: “Bioplásticos Divertidos”, *Pabellón de la ciencia STEAM-UABC, III Festival Aeroespacial Mexicali en las Alturas*, 25 noviembre 2023, Mexicali, B.C. México
5. Taller: “Bioplásticos Divertidos”, *Pabellón de la ciencia STEAM-UABC, Fiestas del Sol*, 30 octubre 2023, Mexicali, B.C. México.