



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES ADICIONADAS CON EXTRACTO DE COL MORADA (*Brassica oleracea var. capitata*) COMO INDICADORES DE PH”

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

DANIELA ALEJANDRA ROBLES VENCES

ASESORA

DRA. MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES

COASESOR

DR. JORGE ALBERTO GARCÍA FAJARDO



Abril 2023

ÍNDICE

<i>Dedicatorias</i>	¡Error! Marcador no definido.
<i>Agradecimientos</i>	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO	11
1.1 BIOPELÍCULAS	12
1.1.1 Quitosano	13
1.1.1.1 Propiedades funcionales	15
1.1.2 Ácido acético como disolvente	17
1.1.3 Plastificantes	18
1.1.3.1 Polietilenglicol	18
1.1.3.2 Sorbitol	19
1.1.3.3 Glicerol	19
1.1.4 Métodos de elaboración	20
1.1.4.1 Extrusión.....	21
1.1.4.2 Casting.....	21
1.1.5 Propiedades físicas	22
1.1.5.1 Espesor	22
1.1.5.2 Solubilidad	23
1.1.5.3 Color	23
1.1.6 Aplicaciones de las biopelículas	24
1.2 EMPAQUES ALIMENTICIOS	25
1.2.1 Activos	26
1.2.2 Inteligentes.....	26
1.3 GENERALIDADES DE LA COL MORADA (<i>Brassica olerace</i> var. <i>capitata</i>).....	27
1.3.1 Fitocompuestos de <i>Brassica olerace</i> var. <i>capitata</i>	28
1.3.1.1 Antocianinas.....	28
1.3.1.1.1 Estructura	29
1.3.1.1.2 Estabilidad	30
1.3.1.1.3 Efecto del pH en las antocianinas	32
1.3.1.1.4 Efecto de la luz y temperatura en la estabilidad de las antocianinas	32
1.3.1.1.5 Capacidad antioxidante de las antocianinas: MÉTODO DPPH*	33

1.4	PARÁMETROS DE EVALUACIÓN EN BIOPELÍCULAS COMO INDICADORES DE pH	34
CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN		35
CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS		37
CAPÍTULO 4 OBJETIVOS.....		39
2.1	OBJETIVO GENERAL	40
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES	40
CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS.....		41
5.1	MATERIALES.....	42
5.1.1	Material vegetal	42
5.1.2	Material.....	42
5.2	MÉTODOS	43
5.2.1	ETAPA 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.....	44
5.2.1.1	Secado de la muestra	44
5.2.1.1.1	En horno de convección	44
5.2.1.1.2	Por liofilizado.....	44
5.2.1.1.3	A la intemperie.....	44
5.2.1.2	Método de extracción a partir de pulverizado y hojas en fresco	44
5.2.1.3	Caracterización química de los extractos.....	45
5.2.1.3.1	Cuantificación de antocianinas monoméricas	45
5.2.1.3.2	Cuantificación de la capacidad antioxidante por DPPH*	45
5.2.1.3.3	Evaluación del color	46
5.2.1.4	Selección de la tecnología para la obtención del extracto.....	46
5.2.2	ETAPA 2. ELABORACIÓN DE LA BIOPELÍCULA.....	46
5.2.2.1	Elaboración de las biopelículas	46
5.2.3	ETAPA 3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS	47
5.2.3.1	Determinación del espesor	47
5.2.3.2	Determinación de la solubilidad (S)	47
5.2.3.3	Prueba de la eficiencia como indicador de pH.....	47
5.2.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		49
6.1	ETAPA 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	50
6.1.1	Evaluación de diferentes tipos de secado en la obtención de pulverizado de hojas.....	50
6.1.2	Caracterización del tamaño de partícula de los polvos obtenidos	51

6.1.3	Obtención de extracto de col a partir de las hojas en fresco	53
6.1.4	Determinación de antocianinas	53
6.1.5	Capacidad antioxidante.....	57
6.1.6	Evaluación del color de los extractos por colorimetría.....	58
6.2	ETAPA 2. ELABORACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS	62
6.3	ETAPA 3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS	63
6.3.1	Caracterización de las propiedades físicas de las biopelículas	63
6.3.2	Evaluación de la funcionalidad de la biopelícula como indicador de pH.....	65
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES.....		67
CAPÍTULO 8 PERSPECTIVAS		69
CAPÍTULO 9 REFERENCIAS.....		71
CAPÍTULO 10 ANEXOS		79
Anexo 1 Cuantificación de antocianinas.....		80
Anexo 2 Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH*		81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Rendimiento en el proceso de secado por cada 1000g de col morada.....	50
Tabla 2 Rendimiento en el proceso de extracción en fresco por cada 1000g de hojas de col morada	53
Tabla 3 Contenido de antocianinas totales de los extractos obtenidos a partir de las diferentes tecnologías	54
Tabla 4 Capacidad antioxidante por DDPH* en extractos de <i>B. oleracea</i> obtenidos con el prensado de sus hojas en fresco	58
Tabla 5 Valores de las variables L*, a*, b* y ΔE del extracto obtenido a diferentes valores de pH. 60	
Tabla 6 Caracterización de la solución formadora de biopelículas.....	62
Tabla 7 Caracterización de las propiedades físicas de las biopelículas.....	64
Tabla 8. Preparación de la curva patrón de DPPH*	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura química de la quitina y del quitosano	14
Fig. 2 Estructura química del ácido acético.....	17
Fig. 3 Estructura química del glicerol	20
Fig. 4 Diagrama para la obtención del extracto a partir de col, formulación y evaluación de la funcionalidad de las biopelículas	43
Fig. 5 Distribución del tamaño de partícula obtenido por tres métodos de secado diferentes (intemperie, horno y liofilizado).....	51
Fig. 6 Polvo obtenido a partir de la molienda de las hojas de col morada correspondientes al secado en intemperie (A), por liofilizado (B) y en horno (C).....	52
Fig. 7 Comparación de medias del contenido de antocianinas entre las diferentes tecnologías de extracción. L (liofilizado), H (horno), I (intemperie), P (prensado), F (licuado).....	56
Fig. 8 Tonos obtenidos por la adición de buffer de ácido cítrico al extracto de col morada en valores de pH 1-14	59
Fig. 9 Obtención de biopelículas por casting. A. Solución formadora de biopelículas con la adición de extracto de col morada. B. Biopelícula con extracto. C. Solución formadora de biopelículas sin adición de extracto. D. Biopelícula de quitosano sin extracto.....	63
Fig. 10 Cambio visual en la coloración de las biopelículas con concentraciones de extracto de col morada (0, 1, 2 y 5%) sometidas a buffer de ácido cítrico con diferentes valores de pH	66
Fig. 11 Preparación de la curva patrón de DPPH•	82

RESUMEN

Actualmente existe una creciente preocupación por la disposición final de residuos plásticos que son utilizados para el almacenaje y transporte de alimentos, por lo que se han buscado alternativas que los puedan sustituir sin comprometer la protección que les ofrecen ante factores externos para conservar su calidad, una de ellas es el desarrollo de biopelículas formuladas a partir de polímeros naturales como el quitosano, que debido a sus propiedades funcionales permite inmovilizar pigmentos derivados de plantas, tal es el caso de las antocianinas presentes en las hojas de col morada *B. oleracea*, estos fitocompuestos tienen la capacidad de presentar distintas tonalidades de color dependiendo del pH del medio en el que se encuentren. Con base en la anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la funcionalidad de películas biodegradables adicionadas con extracto de col morada como indicadores de pH.

Se evaluaron cinco condiciones de extracción, en las que se probaron tres métodos de secado (liofilizado, intemperie y horno) de las hojas de col obteniendo polvos finos para hacer extracciones por maceración usando agua como solvente, y dos métodos para procesar las hojas en fresco (prensado y licuado). Al liofilizar las hojas de se alcanzó un menor porcentaje de humedad permitiendo obtener tamaños de partícula menores a 250 μm después de la molienda de la muestra, lo cual favoreció la extracción de antocianinas al tener mayor área de contacto con el solvente, sin embargo el mejor método para el secado de las hojas de col morada fue usando el horno de convección, teniendo en cuenta los rendimientos en el pulverizado de las hojas, el tiempo del proceso y el gasto energético que conlleva en comparación con el secado por liofilización y secado en intemperie.

El prensado de las hojas de col en fresco fue el mejor método de extracción con base en todos los parámetros evaluados (gasto energético, tiempo de extracción y contenido de antocianinas), en comparación con el licuado, y el procesamiento de las hojas en seco. Con esta tecnología se obtuvo una concentración de antocianinas de 5.791 mg/g BS con propiedad antioxidante (4.95 ± 0.015 TEAC mmol/g).

Se obtuvieron biopelículas a base de quitosano, glicerol como plastificante y ácido acético como disolvente por el método de casting, y usando esta formulación también se obtuvieron biopelículas adicionadas con extracto de col morada incorporando diferentes concentraciones (1,2 y 5% v/v). Se observó que con la adición del extracto las biopelículas tuvieron menores porcentajes de solubilidad y un aumento en su espesor.

Finalmente, se comprobó que las biopelículas adicionadas con extracto de col morada en diferentes concentraciones funcionaron como indicadoras de pH, sin embargo, a partir del 2% de extracto añadido los virajes de color fueron más visibles, conservaron el mismo comportamiento que los extractos de col morada presentando un cambio de color respecto al pH de la solución en la que se encontraban. La transformación en la estructura química de las moléculas de las antocianinas extraídas fueron las responsables del viraje colorimétrico mostrando diferentes tonalidades, rojas, azules y verdes/amarillas.

Las biopelículas adicionadas con extracto obtenido a partir del prensado de hojas *de B. oleracea* en fresco tienen potencial para ser aplicadas como recubrimiento de alimentos en el envasado de estos y de esta manera fungir como sensores sensibles a los cambios de pH atribuidos a su deterioro y descomposición, advirtiendo al consumidor acerca de la calidad de estos.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de contaminación son los generados por la disposición final de los polímeros sintéticos derivados del petróleo, comúnmente conocidos como plásticos. Dichos compuestos se han utilizado como empaques para conservar, transportar y almacenar productos alimenticios debido a su estabilidad y resistencia (Cortés *et al.* 2014); sin embargo, su degradación requiere un largo tiempo, alcanzando con ello un nivel crítico de daños irreversibles al medio ambiente en comparación con los materiales de origen orgánico (López-García *et al.*, 2015).

Debido a la demanda del consumidor por alimentos sanos, frescos y seguros, el objetivo clave de seguridad para los materiales de envasado tradicionales que entran en contacto con ellos es que deben ser lo más inertes posible, se requiere una interacción útil entre el entorno del envasado y el alimento para conservar sus propiedades, incrementar su vida de anaquel y proporcionarle protección de factores externos como calor, luz, presencia o ausencia de humedad, presión, microorganismos, emisiones gaseosas, etc. (Biji *et al.*, 2015), por lo que actualmente se han desarrollado tanto empaques activos como inteligentes que permiten monitorear continuamente al producto, facilitando la toma de acciones para evitar pérdidas económicas y su desperdicio.

Por ello, se han sugerido diversas biomoléculas como el almidón, celulosa, quitosano y proteínas para la formulación de recubrimientos como alternativa para evitar el uso de plásticos (Alves *et al.*, 2007), dichos biopolímeros son renovables, biodegradables e inoocuos, tienen una buena habilidad para la formación de biopelículas y pueden servir como matriz inmovilizadora de extractos naturales de diferentes fuentes vegetales que les confiere las propiedades de empaques inteligentes, ya que les permite fungir como indicadores de algunas condiciones fisicoquímicas que presentan los alimentos como el cambio de pH, derivado del metabolismo de descomposición del producto (Dong *et al.*, 2020). La col morada es una planta rica en antocianinas, las cuales le dan la capacidad de virar su tonalidad a diferentes valores de pH, por lo que sus extractos podrían ser una buena opción para utilizar en la elaboración de empaques inteligentes usados como indicadores de descomposición en productos alimenticios.

Con base en lo anterior, en este trabajo se propone el proceso de extracción de antocianinas a partir de col morada en fresco, su incorporación en películas biodegradables utilizando una matriz de quitosano y glicerol, y la evaluación de su funcionalidad como indicadores de pH en recubrimientos alimenticios.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 BIOPELÍCULAS

Las biopelículas son matrices que se pueden formar a partir de polímeros extraídos de diversas fuentes naturales y actualmente su estudio ha recibido interés debido a su aplicación como revestimiento de alimentos (Silva-Pereira *et al.*, 2015). A causa de los problemas generados con los empaques plásticos y a la creciente demanda por sistemas de empaque más eficientes con los cuales el alimento requiera un tratamiento mínimo con agentes químicos y sintéticos, se ha favorecido el estudio de compuestos poliméricos tales como proteínas, polisacáridos y sus derivados, ya que son abundantes, su proceso de obtención es simple y de forma económica a partir de fuentes renovables, son biocompatibles, se degradan en el medio ambiente mediante procesos físicos, químicos o biológicos y no son tóxicos (Palma-Rodríguez *et al.*, 2017), además poseen atributos fisicoquímicos y funcionales que los convierten en alternativas para disminuir y reemplazar el uso de polímeros derivados del petróleo.

La principal diferencia entre una biopelícula comestible y un recubrimiento radica en su elaboración y aplicación sobre el alimento, un recubrimiento es una capa delgada de material comestible que se aplica sobre la superficie del alimento en forma líquida, comúnmente por aspersion o inmersión, mientras que la biopelícula es preformada por separado para posteriormente ser colocada como una lámina sólida sobre el producto (Falguera *et al.*, 2011). La utilización de biopelículas se ha hecho durante siglos para prevenir la pérdida de humedad, permitir el intercambio de gases, proporcionar esterilidad y evitar el menoscabo de los componentes de los alimentos, son capaces de mantener sus características fisicoquímicas y organolépticas, son comestibles y pueden ser un medio para conservar compuestos de interés que se integran a su estructura, lo que ha permitido que sean las nuevas tendencias en el desarrollo de envases (Pavlath *et al.*, 2013). Las biopelículas poseen propiedades tanto físicas como mecánicas que dependen directamente de su formulación y el objetivo de su uso final. Para dicha formulación se pueden emplear biopolímeros producidos por microorganismos como goma gelana y pululano, por síntesis química como el poliacido láctico, y los directamente extraídos de la biomasa, tales como, proteínas tanto de fuente animal como vegetal (caseína, gluten, zeína de maíz, gelatina,

colágeno) y polisacáridos (celulosa, quitosano, almidón, alginato, agar, carragenina, pectina), son algunos de los más utilizados en aplicaciones de envasado de alimentos (Kumari *et al.*, 2022; Palma-Rodríguez *et al.*, 2017); la selección del polímero adecuado, o la mezcla de los mismos para la producción de las biopelículas depende de la aplicación específica que tenga, pueden ser para alimentos frescos o mínimamente procesados.

Se requiere de la dispersión del biopolímero en un disolvente (agua, etanol o ácidos orgánicos) y la adición de aditivos como plastificantes o aglutinantes para obtener soluciones filmogénicas que después de ser preparadas se puedan someter a un secado para formar películas por casting o recubriendo directamente al alimento (Serrano *et al.*, 2022). Las películas fabricadas a partir de biopolímeros se pueden diseñar para que tengan características ópticas, mecánicas, de permeabilidad y biodegradabilidad que sean apropiadas para crear materiales de embalaje inteligente (activos e inteligentes). Si bien mantener la calidad y la seguridad de los alimentos es una de las funciones del envasado de alimentos, el envasado moderno también es capaz de informar al consumidor sobre la calidad de los alimentos y su idoneidad para el consumo. Para este propósito, varios sistemas de envasado inteligente basados en indicadores colorimétricos pueden proporcionar a los consumidores un control de la calidad en tiempo real de los alimentos envasados a través de sensores o indicadores, especialmente de detección de pH.

A continuación, se describen los principales componentes utilizados en la elaboración de biopelículas.

1.1.1 Quitosano

El quitosano, o químicamente nombrado poli[β -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranos], es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Yoshida *et al.*, 2014) y uno de los más utilizados para la formación de biopelículas debido a sus propiedades. Es un polisacárido lineal que en estado sólido está en forma de copos o polvo semicristalino y se encuentra presente en el exoesqueleto de algunas especies de insectos, artrópodos, arácnidos y moluscos, así como en las paredes celulares de algunos hongos y algas (Arafa *et al.*, 2021b), sin embargo, industrialmente las principales fuentes de

obtención han sido el cangrejo y cáscaras de camarón a partir de un proceso parcial de desacetilación química o enzimática de la quitina.

La quitina (del griego tunic, *envoltura*) fue descubierta en 1811 por Braconnot trabajando con hongos (Crini, 2022). Éste polisacárido se encuentra conformado por unidades β (1-4)-D-glucosamina con un grado variable de N-acetilación, cuando este grado de desacetilación (GD) es mayor al 50% aproximadamente, se denomina quitosano y presenta en su estructura dos monómeros que lo forman, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, los cuales se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la cadena y se encuentran ligados entre sí por un enlace glucosídico β -(1-4) (Melaj, 2012; Pillai *et al.*, 2009), además posee dos grupos hidroxilo, uno primario en el sexto carbono, y uno secundario en el tercer carbono, y a diferencia de la quitina que en el segundo carbono presenta una acetamina, el quitosano tiene un grupo amino como se muestra en la Fig. 1.

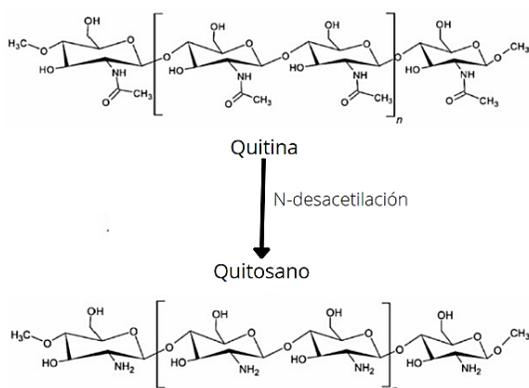


Fig. 1 Estructura química de la quitina y del quitosano
Elaboración propia en Canva.com

Fue sintetizado por primera vez por Rouget en 1859 cuando generó la hidrólisis de la quitina en un medio alcalino usando hidróxido de potasio a altas temperaturas (Crini, 2022), en la actualidad usualmente se sigue obteniendo a través de este método o también usando hidróxido de sodio, la transformación de quitina en quitosano modifica sus propiedades haciéndolo soluble en ácidos inorgánicos y orgánicos con pH < 6.5, tales como el acético.

El quitosano es biodegradable, biocompatible, hidrófilo, no tóxico, y muestra una alta afinidad por la mayoría de los colorantes, ya que tiene grupos amino libres, que en pH ácido están protonados y, la operación de adsorción se facilita bajo esta condición, por lo que la

conformación de sus cadenas pueden servir como matriz inmovilizadora de pigmentos naturales extraídos de diferentes plantas o vegetales (Carvalho *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2014), también tiene la capacidad de formación de películas entre muchas otras aplicaciones en la industria alimentaria, como el desarrollo de recubrimientos (Silva-Pereira *et al.*, 2015) por mencionar alguna, sin embargo, con el paso de los años ha atraído una enorme atención en la investigación en diversas áreas, en la ambiental para el tratamiento de agua eliminando contaminantes cargados negativamente, en la agricultura como encapsulante de fertilizantes de acción prolongada o en la medicina como componente del apósito para heridas debido a sus propiedades únicas, como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la actividad antibacteriana, la hemostasia y su efecto anestésico (Arafa *et al.*, 2021b; Kumari *et al.*, 2022).

1.1.1.1 Propiedades funcionales

El quitosano cuenta tanto con propiedades biológicas como químicas. Suele ser caracterizado en términos de su calidad, forma física y propiedades intrínsecas como pureza, masa molecular y grado de desacetilación. Tiene un peso molecular comprendido entre 10 – 1 000 kDa (Pillai *et al.*, 2009) dependiendo de la fuente de quitina a partir de la cual se obtenga y se comercializa como un compuesto de bajo, medio y alto peso molecular, con valores medios de 120, 400 y 600 kDa, respectivamente (Dutta *et al.*, 2004), su peso molecular puede influir en las características de formación de biopelículas como la elasticidad o fragilidad (Hwang *et al.*, 2003), así como en otras propiedades funcionales como la bioactividad, solubilidad o el grado de hinchamiento. Entre mayor sea la longitud de la cadena del polímero se incrementa la formación de puentes de hidrógeno entre distintas cadenas disminuyendo su solubilidad, y entre más descienda el peso molecular, los coeficientes de hinchamiento se reducen, por lo que, en función de éste, el quitosano puede ser utilizado como espesante, regulador de la viscosidad, estabilizador o vehículo de liberación controlada.

El grado de desacetilación condiciona las propiedades funcionales, biológicas y fisicomecánicas en las aplicaciones del biopolímero, ya que influye en la conformación de la molécula de quitosano a fuerzas iónicas, de elongación y de tensión; se define como la

fracción o porcentaje de unidades no acetiladas a lo largo de la cadena de quitosano. Su grupo amino tiene un pka de 6.5, lo que le confiere una carga positiva y una relativa solubilidad en soluciones ácidas orgánicas incluyendo el ácido fórmico, acético, láctico, oxálico, e inorgánicas como el ácido clorhídrico, bromhídrico o iodhídrico. La solubilidad del quitosano también depende del grado de desacetilación, de la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena principal, del pH y de la naturaleza del ácido utilizado para la protonación, la concentración de protones debe ser por lo menos equivalente a la concentración de $-NH_2$ involucrados para propiciar la ruptura de los puentes de hidrógeno de su cadena (Pillai *et al.*, 2009). Los grupos amino, mediante enlaces dativos, también son los principales sitios de integración que le confieren al quitosano la capacidad para formar complejos con iones metálicos mediante diferentes modelos de mecanismo.

Su naturaleza catiónica es una característica única que tiene un importante efecto en propiedades como biodegradabilidad, adhesividad y biocompatibilidad, entre otras. Cuando el quitosano se suministra vía oral es un polisacárido no biodisponible, necesita ser disuelto en el pH ácido del estómago y adherirse a la mucosa intestinal para que enzimas como la lisozima, quitosanasa o pancreatina puedan hidrolizarlo, entre más desacetilado se encuentre, más lenta es su degradación con lisozima. Es biocompatible porque presenta aceptabilidad biológica al interactuar con tejidos orgánicos, las células son atraídas por el quitosano, se adhieren y proliferan favorablemente.

Debido a su carácter antimicrobiano (Badawy *et al.*, 2011) y a sus propiedades de gelificación para la formación de películas, el quitosano es un material potencial para el embalaje de alimentos, se ha buscado mejorar sus ventajas en la aplicación y elaboración de materiales funcionales avanzados con su modificación, donde se ha buscado incorporar sustituyentes en sitios específicos de la molécula (Carvalho *et al.*, 2019). Sin embargo, aún con estas modificaciones, comúnmente las películas de quitosano son rígidas y requieren de la adición de plastificantes o entrecruzantes para reducir las fuerzas de fricción entre las cadenas de polímeros, como los puentes de hidrógeno o las fuerzas iónicas de Van der Waals, a fin de mejorar las propiedades mecánicas (Park, 2002).

1.1.2 Ácido acético como disolvente

Para la formulación de las biopelículas se requiere de disolventes que permitan la dispersión e incorporación de la matriz estructural de los biopolímeros, así como de otros aditivos tales como plastificantes, reticulantes, antimicrobianos, antioxidantes o emulsionantes que le confieran características particulares, dentro de los disolventes más utilizados se encuentran agua, etanol y ácidos orgánicos, entre los que destacan el ácido acético (Solano-Doblado *et al.*, 2018).

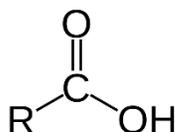
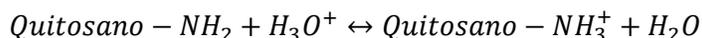


Fig. 2 Estructura química del ácido acético. Fuente: Pravasi, (2014).

El ácido acético es uno de los ácidos carboxílicos más simples (Fig. 2), es un líquido transparente e incoloro que tiene un olor acre. Su fórmula es $\text{CH}_3\text{-COOH}$, tiene una masa molecular de 60.052 g/mol y un pH de 4 (Pravasi, 2014), este ácido es débil, por lo que permite llevar a cabo la solubilización del quitosano y determinar el grado de ionización de sus grupos amino, el quitosano en medio ácido ($\text{pH} < 6$) se convierte en un polielectrolito por la susceptibilidad a la protonación de los grupos -NH_2 presentes en la estructura de la glucosamina que lo conforma, por lo que se le considera una base polimérica débil. Arriba de pH 6, las aminas se desprotonan y el polímero pierde su carga, se vuelve insoluble. El comportamiento interesante que presenta el quitosano en presencia de ácido acético es que, a grandes concentraciones de ácido, la viscosidad de la solución de quitosano permanece casi constante no solo debido a la protonación completa sino también a la baja concentración iónica en relación con el pK del ácido acético, el valor de pKa del quitosano depende de su grado de N-acetilación y la solubilidad de este depende de la concentración iónica. Se ha observado que se logra una solubilización completa cuando su grado de protonación es de 0.5, sin embargo, considerado que de ésta depende de la cantidad de quitosano que se pretenda disolver, la concentración comúnmente utilizada en su preparación es al 1%. La siguiente reacción de equilibrio describe el estado de ionización del quitosano:



1.1.3 Plastificantes

Los agentes plastificantes son algunos de los aditivos en su mayoría líquidos que pueden ser agregados a la formulación de la solución formadora de biopelículas con el fin de mejorar sus propiedades, aumentan la flexibilidad y elongación del material elaborado mediante la reducción de sus fuerzas intermoleculares, además de disminuir la actividad del agua superficial y la velocidad en la pérdida de humedad de los alimentos recubiertos (Solano-Doblado *et al.*, 2018). Algunos plastificantes tales como alcoholes polihídricos, agua, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, aminas, ésteres, cerámicas y aceites son usados, sin embargo, los de uso más común son los polioles o glicoles debido a su bajo peso molecular y cadenas cortas, especialmente el glicerol o glicerina, aunque el uso de etilenglicol, propilenglicol, butanodiol, sorbitol, o manitol también han sido empleados (Enríquez *et al.*, 2011).

Se busca que los plastificantes adicionados tengan una presión de vapor baja para evitar que se volatilicen al finalizar el proceso de extrusión o secado de la solución formadora de biopelículas, y que la incorporación de dichos plastificantes disminuya la temperatura de fusión y la temperatura vítrea, cambiando así el comportamiento reológico de la solución debido a que logran movilizar las moléculas, confiriéndole plasticidad al material (Enríquez *et al.*, 2011; Solano-Doblado *et al.*, 2018).

1.1.3.1 Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es un compuesto de poliéter soluble en agua que tiene una naturaleza no tóxica, biocompatible y biodegradable. El peso molecular del PEG depende de que su forma sea líquida o sólida, lo que contribuye a que su temperatura de fusión sea diferente, comúnmente es utilizado con pesos moleculares de 400 o 1000 g/mol, con puntos de fusión de 4 a 8 y de 37 a 40^o C, respectivamente. Las aplicaciones del PEG son múltiples, como lubricantes para usos industriales, excipientes en productos farmacéuticos, dispersantes en dentífricos, agentes antiespumantes en alimentos o procesos industriales (Chang *et al.*, 2023), dentro de las cuales destaca su implementación como plastificante en la formulación de biopelículas, su adición y mezcla a soluciones que contienen quitosano pueden dar lugar a mayores índices de hinchamiento, aumenta el volumen libre, facilita los

movimientos moleculares y disminuye las propiedades de barrera de las películas poliméricas, las biopelículas resultantes exhiben transparencia, estabilidad térmica y resistencia al agua mejoradas (Dong *et al.*, 2023). Este plastificante ha mostrado tener buena sinergia con otros plastificantes que pueden incrementar las propiedades de la red polimérica, así como disminuir el grado de cristalización del quitosano y al tener un alto peso molecular es poco probable que migre del polímero a la superficie del alimento, sin embargo, se debe considerar la concentración en la que se agrega para evitar una separación de fases en la biopelícula (Shojaee *et al.*, 2020).

1.1.3.2 Sorbitol

Existen siete alcoholes de azúcar también llamados alcoholes polihídricos o polioles, que han sido aprobados internacionalmente para su uso en productos alimenticios debido a que pueden ser sustitutos naturales del azúcar (Grembecka, 2019), el sorbitol es uno de ellos, tiene un peso molecular de 182 g/mol (Enríquez *et al.*, 2011) y su adición como plastificante en soluciones de polímeros para la formación de biopelículas ayuda a mejorar sus propiedades mecánicas, así como la permeabilidad al vapor de agua, propiedades térmicas, estabilidad, algunas veces el color y el porcentaje de elongación (Dong *et al.*, 2023; Solano-Doblado *et al.*, 2018)

Al contar con seis grupos hidroxilo puede interactuar intra e intermolecularmente mediante enlaces de hidrógeno, lo que permite una alta compatibilidad del plastificante con polímeros como el quitosano o el almidón (Arrieta *et al.*, 2018). Se ha encontrado que se forman interacciones electrostáticas con el quitosano y que la cantidad de sorbitol que se añade para la formación de biopelículas es importante porque influye en su estructura, concentraciones menores al 10% p/v con relación a la solución formadora facilita la cristalización del quitosano mientras que por encima del 30% en peso se induce una separación de fases (Ma *et al.*, 2018).

1.1.3.3 Glicerol

El glicerol es un compuesto natural con muchos usos industriales, de consumo, alimentarios y médicos, es un polioliol de cadena corta que tiene un peso molecular de 92 g/mol y es soluble en agua por lo que ha sido empleado frecuentemente como plastificante en la elaboración

de biopolímeros (Fig. 3). Esta capacidad plastificante da como resultado principal una interacción directa entre el plastificante y el polímero de quitosano, permitiendo su higroscopicidad y dando un efecto adicional en la absorción de humedad, además, se ha reportado que mejora la flexibilidad de las biopelículas resultantes debido a que en su incorporación ocurren modificaciones estructurales en la red del polímero facilitando los movimientos de sus cadenas y aumentando su espacio intermolecular (Alves *et al.*, 2007). Cuanto más se incluye en la matriz polimérica esta se vuelve menos densa, la permeabilidad al vapor de agua, la elongación y la deformación se incrementa mientras que el esfuerzo de ruptura y la cristalinidad disminuyen (Arrieta *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2023).

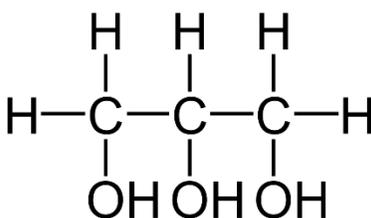


Fig. 3 Estructura química del glicerol. Fuente: Ma *et al.*, (2018)

Algunas de las propiedades que presenta han sido determinantes en la elección de este plastificante en la formulación de biopelículas, el glicerol exhibe una buena compatibilidad y baja volatilidad para interactuar con enlaces de hidrógeno, permitiendo así una formación estable, es el plastificante más utilizado debido a su disponibilidad, baja exudación y eficiencia (Ma *et al.*, 2018), además de que también tiene una buena absorción en el tracto gastrointestinal y se distribuye por todo el espacio extracelular, por lo que posee una baja toxicidad aguda y crónica en humanos y animales, incluyendo invertebrados acuáticos, algas, bacterias, peces y anfibios. La mayor parte del glicerol absorbido por el cuerpo se usa para formar triglicéridos; sin embargo, parte es metabolizada por la glicerol quinasa a α -glicerofosfato y utilizada en la síntesis de glucosa o glucógeno o metabolizada posteriormente a dióxido de carbono y agua (Wernke, 2014).

1.1.4 Métodos de elaboración

Para la elaboración de biopelículas se han desarrollado diferentes técnicas, entre las que destacan los métodos por eliminación de disolvente, por gelación térmica, por

solidificación, por “electrospraying” o por microfluidización, y cada uno puede modificar sus propiedades finales, sin embargo, las más comunes son por los métodos de extrusión y/o de vaciado en placa o “casting” (Solano-Doblado *et al.*, 2018).

1.1.4.1 Extrusión

Este método combina varias operaciones unitarias, en la industria alimentaria comúnmente se utiliza para texturizar materiales a base de almidón y proteínas, consiste en transportar, mezclar y comprimir soluciones para formar masas a alta temperatura antes de darle forma a través de un molde para obtener formas bien definidas como láminas o varillas (Guy, 2016; Mendes *et al.*, 2016a). Esta técnica de plastificación se ha desarrollado desde los años noventa para el procesamiento de bioplásticos (Matet *et al.*, 2015).

La extrusión de doble tornillo es popular y altamente flexible, utiliza pares de tornillos corrotantes que se entrelazan para aumentar progresivamente la presión y empujar hacia adelante, mezclando los ingredientes necesarios para fabricar las biopelículas a través de una placa donde se pueden expandir, en este proceso no se utilizan grandes cantidades de disolventes y permite obtener una amplia gama de productos innovadores presentando múltiples ventajas para el sector del envasado alimentario (Rodríguez *et al.*, 2021), además, al ser un sistema de producción en continuo tiene la ventaja de ser un reactor por las altas presiones y temperaturas que se pueden alcanzar, por lo que es adecuado en la industria para la producción de biopelículas a gran escala (Mendes *et al.*, 2016b).

1.1.4.2 Casting

Las biopelículas de quitosano generalmente son producidas por casting, es decir, por la dilución del polvo o escamas de quitosano en una solución acuosa ácida, que junto con el plastificante y demás aditivos es vertida como una delgada capa que se somete a evaporación por medio de temperaturas controladas (Solano-Doblado *et al.*, 2018). Como en el caso de otros polímeros termoplásticos tradicionales, el quitosano exhibe una temperatura de degradación por debajo de su punto de fusión, por lo tanto, los materiales a base de quitosano preparados en equipos de procesamiento son incorporados como partículas sólidas (Matet *et al.*, 2015).

1.1.5 Propiedades físicas

Existen algunas cualidades funcionales en las biopelículas que se deben considerar para el embalaje de alimentos, como lo son sus propiedades mecánicas, físicas, de barrera, antimicrobianas y antioxidantes, ya que le confieren características al producto final dependiendo del objetivo de la aplicación, dichas propiedades funcionales se pueden mejorar incorporando diferentes extractos de plantas y/o aceites esenciales (Gupta *et al.*, 2022).

Dentro de las propiedades físicas que resaltan para caracterizar las biopelículas se encuentran el color, la solubilidad y el espesor, las cuales se ven influidas por factores como la adición de plastificantes en la etapa de formulación debido a que de ello depende la elasticidad, grado de hidrofobicidad, barrera de protección y de intercambio de gases con el exterior, o las condiciones de secado como la temperatura y velocidad, dependientes de la humedad relativa del ambiente (Solano-Doblado *et al.*, 2018). Algunos métodos para evaluar las propiedades de las biopelículas incluyen técnicas como la difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja, microscopia electrónica de barrido, ángulo de contacto, entre otras (Jakubowska *et al.*, 2023).

1.1.5.1 Espesor

El espesor es importante porque las biopelículas tienen la capacidad de preservar al alimento sirviendo como barrera de protección y de intercambio de gases, así como de la permeabilidad al vapor de agua (Solano-Doblado *et al.*, 2018), la vida útil del producto envasado puede acortarse debido a características de barrera inadecuadas que lo exponen a elementos como el agua, humedad y oxígeno (Gupta *et al.*, 2022). La mayoría de las biopelículas formadas a partir de polímeros de fuentes naturales como el quitosano, resultan poseer buenas propiedades de barrera ya que son semi permeables a los gases, su eficiencia depende de las condiciones de humedad relativa que rodee a la película ya que se busca controlar el intercambio de O₂, CO₂ y vapor de agua, este último se calcula midiendo la facilidad con la que el vapor puede penetrar el material y generalmente influye la porción hidrofóbica de los componentes en la formulación, se busca que la transferencia de humedad desde el producto al medio ambiente sea lo más lenta posible y controlada,

por lo tanto, un incremento en el grosor disminuye la permeabilidad del agua (López-García *et al.*, 2015).

1.1.5.2 Solubilidad

La solubilidad de las biopelículas es un indicador de la resistencia que tiene como recubrimiento cuando se expone a un medio que contenga agua o humedad (Serrano *et al.*, 2022) una mayor solubilidad de las biopelículas puede indicar una menor resistencia al agua provocando su disolución y perdiendo su efecto protector sobre la superficie del alimento. La solubilidad de las biopelículas puede verse modificada dependiendo de los aditivos que se incluyan en la formulación, cuando se agregan flavonoides, se tiene conocimiento de que los grupos hidrofílicos del quitosano interactúan con éstos, por lo tanto, se generan menos sitios disponibles para interactuar con las moléculas del agua provocando reducción en el contenido de humedad (Jakubowska *et al.*, 2023).

1.1.5.3 Color

El color es uno de los criterios más importantes para la identificación y percepción de la calidad y apariencia de los alimentos, puede incluso considerarse como una de las características más impresionantes y atractivas de los productos alimenticios, que incide directamente en la selección, preferencia, aceptabilidad y tendencia de consumo (Martins *et al.*, 2016), el color que se busque en las biopelículas depende directamente de la aplicación objetivo, pueden ser transparentes, opacas o incluso contener aditivos que modifiquen su coloración y tonalidad, en la literatura, existen reportes sobre colorantes contenidos en tejidos vegetales utilizados como sensores, con el objetivo de hacer una determinación colorimétrica del pH en productos alimenticios durante un período de tiempo (Andretta *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2014). Los cambios de color en este tipo de extractos se deben a la presencia de sustancias fenólicas o conjugadas, como las antocianinas, las cuales están sujetas a cambios estructurales cuando hay una variación en el pH (Pereira *et al.*, 2015), permitiendo un viraje en tonalidades de rojo a púrpura, violeta, azulado, verde y amarillo.

1.1.6 Aplicaciones de las biopelículas

La versatilidad de aplicaciones de las biopelículas poliméricas es extensa, ya que se pueden encontrar en la agricultura, en la industria farmacéutica y en la industria alimentaria como recubrimientos en alimentos y envases, principalmente (Falguera *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2022; Melaj, 2012; Ribeiro Sanches *et al.*, 2021). La condición de uso como empaque o envase para alimentos involucra varios aspectos que pueden jugar un papel importante en la determinación de la vida útil, entre los que se encuentran: los procesos fisiológicos, químicos, físicos o microbiológicos, dichos aspectos dependen de los requerimientos del alimento (López-García *et al.*, 2015).

Las películas biodegradables son excelentes barreras para el oxígeno, los lípidos y los aromas, y su aplicación como empaque alimenticio ha traído consigo el estudio de su capacidad para formar atmósferas modificadas, de modo que al recubrir un alimento también sirven como un microsistema regulando así el proceso de maduración y extendiendo la vida útil del producto, con lo cual, permiten una respiración lenta pero controlada, lo que reduce la absorción de O₂ del producto contenido dentro del envase mientras funge como una barrera selectiva a los gases CO₂ y al vapor de agua (Falguera *et al.*, 2011). Además, son excelentes para transportar aditivos alimentarios, como antioxidantes y antimicrobianos para reducir el deterioro en almacenamiento prolongado (Ribeiro-Sanches *et al.*, 2021).

La aplicación de biopelículas sensibles a colorantes naturales en modelos de alimentos reales, especialmente alimentos proteicos, ha sido estudiada extensivamente, obteniendo resultados positivos respecto a su funcionalidad (Dudnyk *et al.*, 2018; Silva-Pereira *et al.*, 2015; Siripatrawan & Noipha, 2012; Zhang *et al.*, 2014); tienen la función principal de proteger los alimentos, alargar su vida de anaquel, retrasar su envejecimiento disminuir su desperdicio, evitando la pérdida o ganancia de humedad que causan turgencia o modificación en la textura de algunos productos hortofrutícolas, retardan sus cambios químicos como color, aroma y valor nutricional actuando como barrera contra el intercambio de gases que influyen en la calidad sensorial, estabilidad química y microbiológica. (Solano-Doblado *et al.*, 2018).

Cuando ocurre un proceso de deterioro en un alimento, se puede detectar un cambio de pH, debido a esto, los cambios de pH pueden servir como indicadores de la calidad de los alimentos, ya que revelan el estado del producto. Los indicadores de pH colorimétricos pueden incorporarse en las biopelículas para conferirle propiedades bioactivas, con lo cual pueden ser catalogadas dentro de los envases inteligentes y monitorearse mediante cambios de color visuales (Biji *et al.*, 2015). Las antocianinas pueden usarse como indicadores naturales del cambio de pH; son pigmentos naturales responsables de la coloración azul, púrpura, violeta y roja en frutas y verduras (Gupta *et al.*, 2022; Jakubowska *et al.*, 2023). De acuerdo con el pH, las sustancias fenólicas presentes en la antocianina tienen su estructura química modificada, cambiando su color (Sutharsan *et al.*, 2022).

1.2 EMPAQUES ALIMENTICIOS

Las civilizaciones antiguas emplearon empaques primitivos o rudimentarios utilizando materiales naturales como yute, bambú, hojas o piel de animales para proteger y conservar sus alimentos, sin embargo, con la llegada de la revolución Industrial se desarrollaron nuevos materiales (Gupta *et al.*, 2022). Los envases se utilizan para mantener la seguridad y calidad de los alimentos, protegen el producto de factores deteriorantes y de condiciones ambientales externas como calor, luz, presencia o ausencia de humedad, presión, microorganismos, emisiones gaseosas, etc, previniendo su daño y pérdidas económicas (López-García *et al.*, 2015), por ende, el envasado de alimentos juega un papel fundamental en la industria alimentaria.

Se pueden clasificar por su función en primarios (mantienen contacto directo con el producto), secundarios (contenedor de uno o varios envases primarios que se encarga de proteger e identificar al producto) y terciarios (ayuda a la distribución y protección del producto a lo largo de la cadena comercial) (López-García *et al.*, 2015; Solano-Doblado *et al.*, 2018) y actualmente, debido a la creciente preocupación por consumir alimentos seguros y el comportamiento de los consumidores, han surgido diversas alternativas en la tecnología de envasado, es cada vez más crucial que sea sostenible y respetuoso con el medio ambiente por lo que, se han desarrollado varios tipos de embalaje utilizando polímeros biodegradables (Gupta *et al.*, 2022).

Polisacáridos naturales como el quitosano han sido ampliamente propuestos como sustitutos de materiales sintéticos, particularmente para la fabricación de películas de empaques, debido a que este polímero cuenta con propiedades antimicrobianas en los sistemas de envasado de alimentos contra diversas bacterias gramnegativas y grampositivas, levaduras y hongos filamentosos, su aplicación se ha utilizado para proteger la calidad y mejorar la vida útil de productos como el pescado, leche, frutas y verduras, carne, etc. (Gupta *et al.*, 2022), además últimamente se ha incluido en el desarrollo de una nueva tendencia que involucra envases funcionales en los que se adicionan compuestos que le confieran ciertas propiedades, dando paso a los envases activos e inteligentes (Jakubowska *et al.*, 2023).

1.2.1 Activos

El envasado activo se puede definir como un sistema en el que ocurre una interacción positiva entre el envase, el alimento y el medioambiente, se refiere a la incorporación de aditivos en el empaque con el objetivo de mantener o extender la calidad del producto y la vida útil. Están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que liberarían o absorberían sustancias del alimento envasado o del entorno que rodea al alimento con el objetivo de mejorar la conservación de los alimentos en el envase y prolongar su seguridad, por lo que, implica la aplicación de varias estrategias como control de temperatura, eliminación de oxígeno, control de humedad, adición de productos químicos como sal, azúcar, carbón, etc. (Biji *et al.*, 2015).

Los empaques activos se clasifican en: no migratorios, que actúan sin promover de manera intencional la migración de compuestos que dañan el alimento, y los de liberación controlada, que permiten la liberación de agentes no volátiles o una emisión de compuestos volátiles en la atmósfera que rodea al alimento (López-García *et al.*, 2015).

1.2.2 Inteligentes

Los sistemas de empaque inteligentes son aquellos que monitorean el estado de los alimentos envasados para dar información al consumidor sobre su calidad durante el transporte y almacenamiento en tiempo real, deben ser simples, sensibles y eficientes (Silva-Pereira *et al.*, 2015). Detectan los cambios alimentarios o ambientales y los informan

mediante la emisión de una señal, la cual puede ser colorimétrica, óptica, química o eléctrica, en respuesta a modificaciones o alteraciones en el entorno, son capaces de llevar a cabo funciones adicionales como detectar, registrar, rastrear o comunicar al consumidor información relacionada a la seguridad del producto que recubran y a diferencia de los componentes activos, los componentes inteligentes no tienen la intención de liberar sus constituyentes en los alimentos (Freitas *et al.*, 2020).

Los consumidores exigen cada vez más colorantes alimentarios naturales como carotenoides, betaínas, antocianinas y clorofilas en lugar de colorantes sintéticos para aplicaciones alimentarias. Como resultado, los envases inteligentes basados en colorantes naturales y biopolímeros se han introducido como la última tecnología en el campo del envasado de alimentos, de modo que, al combinar las propiedades del quitosano con algún extracto vegetal, se puede catalogar dentro de los empaques inteligentes para advertir sobre problemas de descomposición de los alimentos y facilitar la toma de decisiones respecto a su consumo (Alizadeh-Sani *et al.*, 2020). Entre los antioxidantes añadidos en los envases activos, los compuestos fenólicos pueden retrasar el proceso oxidativo y, en consecuencia, promover un aumento en la vida útil de los alimentos perecederos, las antocianinas y los compuestos fenólicos extraídos de la col morada se han propuesto como agentes antioxidantes y antimicrobianos en muchos reportes (Ribeiro Sanches *et al.*, 2021).

1.3 GENERALIDADES DE LA COL MORADA (*Brassica oleraceae* var. *capitata*)

La col morada es una planta bienal, es decir, tarda 2 años en completar su ciclo biológico, y aunque en la actualidad se produce en todos los países, es originaria de las zonas costeras de Europa central y meridional. Se caracteriza por tener hojas grandes y carnosas de color púrpura y tiene una composición de 92% de agua, 6% de carbohidratos, 1% de proteína y una alta cantidad de vitaminas y minerales, así como de una compleja mezcla de fitoquímicos que le confieren propiedades antioxidantes, el grupo más diverso de polifenoles en esta especie son los flavonoides, principalmente las antocianinas (Food and Agriculture Organization, 2007; Gouda *et al.*, 2018; Haddar *et al.*, 2018).

1.3.1 Fitocompuestos de *Brassica oleraceae* var. *capitata*

Los flavonoides son una de las principales clases de compuestos fenólicos, que existen abundantemente en plantas, incluidas frutas, verduras y hierbas. La mayoría de los flavonoides presentes en los extractos de plantas se dividen en seis categorías principales: flavona, flavanona, flavanol, flavonol, chalcona y aurona, que difieren en sus estructuras químicas, especialmente en la sustitución de los anillos aromáticos (Sutharsan *et al.*, 2022). Las hojas de col morada son ricas en una serie de sustancias bioactivas como lo son los flavonoides, incluidos los carotenoides y tocoferoles, así como antocianinas. Su extracto contiene compuestos benéficos para la salud con actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, bactericidas, antifúngicas y antivirales, además puede aplicarse como indicador natural sensible al pH (Arafa *et al.*, 2021a; Gao *et al.*, 2022).

Tanto las frutas como las verduras rojas y azules son las principales fuentes de antocianinas, pero su contenido sufre variaciones importantes entre diferentes especies y dentro de una misma especie. Los factores que influyen en ello incluyen la variedad de plantas, su genética, el clima, el área de cultivo, los procesos de cultivo, el período de cosecha, la maduración, la variabilidad estacional, el procesamiento y el almacenamiento, la luz y la temperatura (Cardoso *et al.*, 2015; Wiczowski *et al.*, 2013).

1.3.1.1 Antocianinas

Se ha descrito que el perfil de antocianinas de *Brassica oleraceae* var. *Capitata* se compone de veinte derivados de glucósidos de cianidina, identificando que la estructura de la antocianina predominante que contiene es la forma no acilada de cianidina-3-diglicósido-5-glucósido (Wiczowski *et al.*, 2013).

El término antocianina se acuñó inicialmente para indicar la sustancia responsable del color aciano (Valavanidis *et al.*, 2013). Las antocianinas son compuestos fenólicos clasificados como flavonoides, que presentan una estructura básica compuesta por tres anillos de carbono, en los que el anillo central es un catión flavilo (Freitas *et al.*, 2020). Son metabolitos secundarios antioxidantes y pigmentos hidrosolubles con colores muy atractivos, particularmente rojo, azul y púrpura, que exhiben sensibilidad a los cambios de pH en el medio, por lo tanto, los extractos de plantas que contienen antocianinas podrían

usarse como indicadores naturales de viraje en el pH (Carvalho *et al.*, 2019). Se sintetizan en el citosol y posteriormente son transportadas a las vacuolas de células epidérmicas en una amplia gama de gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo frutas, hojas, flores y algunos cereales, y tienen importante función en la polinización, como indicadores de estrés y repelentes de algunos insectos, no son tóxicas y son potencialmente aplicadas como colorante para alimentos y cosméticos, comprenden el grupo más grande de pigmentos solubles en agua (Seitz *et al.*, 1988).

Las antocianinas también son consideradas nutraceuticos y se estudian por sus beneficios para la salud que incluyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antimicrobianas, por lo que pueden ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, obesidad o cáncer (Carvalho *et al.*, 2019; Enaru *et al.*, 2021; Mukherjee, 2019). Se ha estimado que la ingesta dietética de antocianinas es de hasta 200 mg/día, más alta que la de otros flavonoides (Valavanidis *et al.*, 2013).

Los pigmentos de antocianina son adecuados como colorantes naturales para alimentos, cosméticos y suplementos dietéticos, debido a la demanda de productos más saludables y sus propiedades antioxidantes (Carvalho *et al.*, 2019). Las antocianinas han sido ampliamente estudiadas y estructuralmente son en su mayoría 3-glucósidos de las agliconas antocianidinas, si bien hay alrededor de 17 antocianinas que se encuentran en la naturaleza, solo 6 están ampliamente distribuidas, dentro de las cuales, las utilizadas con mayor frecuencia incluyen cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, malvidina y petunidina. Las estructuras químicas de estas seis antocianinas difieren entre sí en las posiciones 3' y 5' del anillo B y su variación química de la glicosilación y acilación, cabe mencionar que la cianidina aparece en forma de un pigmento rojo púrpura, similar al color magenta en las frutas y verduras que la contienen (Martins *et al.*, 2016; Reyes *et al.*, 2018).

1.3.1.1.1 Estructura

Químicamente, los flavonoides tienen la estructura general de un esqueleto de 15 carbonos, que consta de dos anillos aromáticos de fenilo (A y B) unidos por una cadena de 3 carbonos formando un anillo heterocíclico oxigenado (C). Esta estructura de carbono se

puede abreviar como C6-C3-C6 (Soković *et al.*, 2021). Las antocianinas están compuestas por antocianidinas glicosiladas, también llamadas agliconas, y su núcleo fundamental es el flavilo, las antocianinas naturales varían en el esqueleto básico de antocianidina, es decir, el número y la posición de los sustituyentes hidroxilo y metoxilo; la identidad, el número y las posiciones en las que los azúcares se unen al esqueleto (Ravanfar *et al.*, 2018). Las antocianidinas rara vez se encuentran en material vegetal fresco debido a su inestabilidad (Pietta *et al.*, 2003).

Generalmente a través del grupo hidroxilo C3 en el anillo C se unen residuos de carbohidratos al esqueleto de antocianidina, los cuales pueden ser glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, ramnosa o rutinosa, y de igual manera en dichos restos de azúcar pueden añadirse ácidos orgánicos dando lugar a la acilación de la estructura inicial. Los compuestos de acilación más comunes incluyen ácidos aromáticos como el ácido p-cumárico, sinápico, gálico, ferúlico y cafeico, pero también una serie de ácidos alifáticos como el ácido málico, succínico, oxálico, tartárico y acético.

La mayoría de las antocianinas tienen un peso molecular que oscila entre 400 y 1200 g/mol y una carga positiva en sus estructuras a un pH ácido, cuando el pH es < 2 el catión flavilio se encuentra estable, lo que implica el equilibrio de cuatro especies moleculares: el catión flavilio básico coloreado y tres estructuras secundarias (la base quinoidal, la pseudobase de carinol y la pseudobase de chalcona) (Reyes *et al.*, 2018). Comúnmente, las antocianinas son de color rojo en ácido, violeta en neutro y azul en solución alcalina, el pH cambia la intensidad del color de las antocianinas, por ejemplo, por la adición de ácidos (Pietta *et al.*, 2003).

1.3.1.1.2 Estabilidad

Las antocianinas pueden realizar interacciones con otros compuestos, pero también entre sí, donde se ven influenciados tanto su color como su equilibrio estructural por lo que, sufren múltiples biotransformaciones, en soluciones ácidas existen cuatro especies de antocianinas en equilibrio: la base quinoidal, el catión flavilio, la pseudobase y la chalcona.

Las antocianinas son generalmente estables a la luz y al calor, pero el pH es el factor más importante que afecta la apariencia visual de las antocianinas (Damant, 2011).

Según la estructura molecular, las antocianinas extraídas de la col morada destacan no solo por la alta concentración de sustrato y su coloración intensa, sino que también tienen una mayor estabilidad que las demás debido al grado de acilación, que es superior al 80%, los grupos hidroxilo están protegidos a través de grupos acilo. Las antocianinas aciladas exhiben una mayor estabilidad contra el calor y la luz, poseen una mayor capacidad antioxidante y muestran un espectro de color más amplio dependiente del pH (Arafa *et al.*, 2021). Se ha establecido que las antocianinas se mantienen en un equilibrio que implica la transformación del catión flavilio en diversas condiciones de pH de modo que, en condiciones muy ácidas, dicho catión es la forma predominante. Cuando el catión flavilio sufre un ataque nucleofílico con agua, forma aductos OH incoloros conocidos como pseudobases (Ye *et al.*, 2015)

Muchos factores influyen en la estabilidad de las antocianinas. El calor y la luz pueden destruir las antocianinas sensibles durante el procesamiento de frutas y verduras. En particular, las antocianinas se destruyen rápidamente en presencia de una alta concentración de azúcar (Pietta *et al.*, 2003). Actualmente, se emplean técnicas de extracción novedosas como alternativa al método de extracción por solventes, que brindan ventajas tales como una mayor recuperación de antocianinas en un tiempo más corto, una menor utilización de solventes y una degradación mínima de la calidad. Sin embargo, la incorporación de antocianinas extraídas en alimentos y productos farmacológicos es limitada debido a su baja biodisponibilidad y relativa inestabilidad frente a condiciones ambientales adversas, como pH, temperatura, enzimas, luz, oxígeno y ácido ascórbico. Además de una mayor estabilidad estructural de las antocianinas a través de la glicosilación y la acilación, su estabilidad podría mejorarse mediante encapsulación, la estabilidad de las antocianinas aumenta al aumentar la metilación y disminuye al aumentar el número de grupos hidroxilo en el anillo B de las antocianinas (Carvalho *et al.*, 2019; Ghareaghajlou *et al.*, 2021).

1.3.1.1.3 Efecto del pH en las antocianinas

Las antocianinas dependen del pH y exhiben un cambio de color reversible. Cuatro formas estructurales de antocianinas pueden explicar esta transición de color cuando se colocan en solución acuosa: el catión flavilio (rojo) en ambiente ácido a pH 1, lo que las hace muy solubles en agua; la base quinoidal (violeta a azul) cuando el pH aumenta entre 2 y 4; la pseudobase carbinol (inoloro) y la chalcona (amarillo pálido / inoloro) cuando el pH se encuentra entre 5 y 6, y finalmente a valores de pH superiores a 7, las antocianinas se degradan según los grupos sustituyentes. Sin embargo, las cuatro formas de antocianinas pueden coexistir en un rango de pH de 4–6 y el catión flavilio mantiene el equilibrio de estas formas (Enaru *et al.*, 2021).

En resumen, la variación del pH del medio favorece la configuración de una o más antocianinas, lo que resulta en un cambio de color de la solución debido a la naturaleza de la estructura molecular, los sustituyentes del anillo B y la presencia de grupos hidroxilo o metoxilo adicionales son responsables de la estabilidad de las antocianinas, que en ambientes neutros disminuyen la estabilidad de la aglicona (Freitas *et al.*, 2020).

1.3.1.1.4 Efecto de la luz y temperatura en la estabilidad de las antocianinas

La luz es necesaria en las plantas para la síntesis de antocianinas, pero acelera su descomposición y su actividad antioxidante. Tanto la intensidad del color determinada por las antocianinas monoméricas como su cantidad disminuyen en función del tiempo, luz y temperatura, mientras que la cantidad de tonalidades marrones aumenta (Enaru *et al.*, 2021).

La temperatura máxima de tratamiento es de 60° C, al aumentarla se produce la degradación de las antocianinas, así como el pardeamiento de los productos en presencia de oxígeno debido al procesamiento térmico, las antocianinas pueden sufrir multitud de mecanismos como la glicosilación, el ataque nucleofílico del agua, la escisión y la polimerización que provoca la pérdida de este pigmento y su degradación. Por lo tanto, la temperatura y la exposición a la luz son otros factores que afectan la estabilidad de la estructura molecular de las antocianinas (Carvalho *et al.*, 2019; Ribeiro-Sanches *et al.*, 2021).

1.3.1.1.5 Capacidad antioxidante de las antocianinas: MÉTODO DPPH•

Un compuesto puede llamarse antioxidante si retrasa o previene la oxidación de un sustrato en bajas concentraciones. La propiedad básica de un antioxidante es que ayuda a limitar el daño oxidativo en el cuerpo humano al prevenir o detectar una cadena de propagación oxidativa al estabilizar el radical producido. En general, las antocianinas neutralizan las especies de radicales reactivos transfiriendo un solo electrón o eliminando el átomo de hidrógeno de los grupos fenólicos. El componente central de la actividad antioxidante de las antocianinas está representado por la oxidación de los grupos hidroxilo fenólicos, más precisamente los grupos para y ortofenólicos, que tienen un papel crucial en la formación de semiquinonas y en la estabilización de los productos de oxidación de un electrón. Medir la actividad antioxidante de muestras biológicas y alimentos es de vital importancia, no solo para asegurar la calidad de los alimentos, sino también para determinar la efectividad de los antioxidantes alimentarios en la prevención y tratamiento de enfermedades basadas en el estrés oxidativo (Enaru *et al.*, 2021).

El método de DPPH• es un procedimiento espectrofotométrico común y de uso frecuente para determinar las capacidades antioxidantes de los componentes. Esta técnica se puede utilizar tanto en muestras sólidas como líquidas y se basa en la capacidad del radical libre (DPPH•) para reaccionar con un donante de hidrógeno (AH⁺). Por lo tanto, la donación de electrones por parte del antioxidante tiene lugar para neutralizar el radical DPPH•. Este radical libre es estable, pero cuando se produce la deslocalización del electrón se obtiene un color púrpura que presenta un pico intenso en la región espectral UV-vis a 517 nm. Cuando el radical DPPH• interactúa con un donante de hidrógeno, se forma la forma reducida, DPPH; esto da como resultado que el color violeta se desvanezca y se vuelva amarillo. Como resultado, la disminución de DPPH• da un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para capturar radicales. Esta técnica es sencilla, rápida y económica, utilizada con éxito para determinar la actividad antioxidante de algunas sustancias. Además, el ensayo DPPH• es el método indirecto más antiguo para determinar la actividad antioxidante y se ha utilizado para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos (Brand-Williams *et al.*, 1995; Choudhury, 2014).

1.4 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN EN BIOPELÍCULAS COMO INDICADORES DE pH

Las reacciones fisicoquímicas, microbiológicas y enzimáticas son procesos continuos que ocurren en las matrices alimentarias, e inevitablemente cambian las composiciones químicas de los alimentos, influyendo en sus cualidades y seguridad. Estos cambios en los compuestos alimentarios pueden combinarse con la variación del valor del pH debido a la producción de especies ácidas o básicas durante la degradación de los alimentos (Kirtil *et al.*, 2016).

Cuando ocurre un proceso de deterioro en un alimento se producen compuestos enzimáticamente, debido a la descarboxilación de aminoácidos, y pueden alterar el pH del entorno alimentario, generando olores y sabores desagradables que pueden no ser aceptados por los consumidores, en alimentos ricos en proteínas pueden producirse amoníaco y trimetilmentina como resultado de las aminas biogénicas de la degradación de su metabolismo enzimático y microbiológico, provocando enfermedades en los consumidores (Silva-Pereira *et al.*, 2015), así mismo, dicho viraje de pH pueden indicar visualmente al consumidor cualquier cambio en la calidad de los alimentos. El uso de la colorimetría cuantifica y describe físicamente la percepción del color humano, según el sistema de color CIElab, la escala para el parámetro L* está entre 100 (blanco) y 0 (negro), mientras que para los parámetros a* y b* son respectivamente +a (rojo) a -a (verde), +b (amarillo) a -b (azul) (Choudhury, 2014), de esta manera, sustancias capaces de detectar variaciones de pH como lo son las antocianinas extraídas de *Brassica oleracea* var. capitata se pueden incorporar a matrices poliméricas con el fin de desarrollar envases inteligentes que indiquen al consumidor mediante diferentes tonalidades el estado en el que se encuentran los alimentos (Freitas *et al.*, 2020).

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

La utilización de quitosano para formular biopelículas que recubran los alimentos y los protejan de las condiciones ambientales y el deterioro recibe una atención considerable debido a la abundancia de este polímero, bajos costos de producción, a su biodegradabilidad y a su posible aplicación como empaque comestible (Argüello-García *et al.*, 2014); sin embargo, a pesar de que existe una amplia información técnica sobre su uso para elaborar biopelículas a partir de este polímero, cada formulación confiere propiedades específicas, por lo que estas no pueden ser usadas de forma universal en todos los alimentos y deben caracterizarse a partir de pruebas experimentales que determinen su posible aplicación. Por otro lado, la col morada (*Brassica oleraceae*) es una planta que posee una alta capacidad antioxidante (Chigurupati *et al.*, 2002) y que puede conferir color a las biopelículas por su alto contenido de antocianinas, al ser de una fuente natural también es biodegradable, tiene toxicidad nula al ser humano y un proceso de inmovilización en matrices poliméricas fácil de realizar (Zhang *et al.*, 2014).

El extracto obtenido a partir de col morada permite visualizar el viraje en un amplio rango de pH, lo que lo hace ideal para ser utilizado como un indicador en el empaque de alimentos, ya que la adición del extracto vegetal a dichas biopelículas modifica su conformación y propiedades bioactivas, de esta forma, cuando el alimento cambie su valor de pH debido a los procesos naturales de descomposición, la biopelícula presentará un vire de color que permitirá al consumidor identificar cuando el alimento ya no es apto para su consumo, previniendo enfermedades provocadas por la ingesta de alimentos en descomposición.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

La biopelícula elaborada a partir de quitosano y glicerol, adicionada con extracto de colmorada, funcionará como indicador colorimétrico en diferentes valores de pH.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la funcionalidad de las películas biodegradables adicionadas con extracto de col morada como indicadores de pH

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Diseñar y evaluar las características de una biopelícula formulada a partir de quitosano y adicionada con extracto de col morada

Determinar las propiedades físicas de la biopelícula elaborada tales como espesor, solubilidad, colorimetría

Evaluar la funcionalidad de la biopelícula como indicador de pH

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y

MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Material vegetal

Las hojas de col morada (*Brassica oleracea* var. capitata) fueron adquiridas en la central de abastos de Monterrey, Nuevo León.

5.1.2 Material

Alcohol etílico absoluto (99.9%), ácido acético glacial (99.7%) y metanol (99.9%) fueron obtenidos de Fermont Reactivos y Equipo S.A de C.V. Acetato de sodio anhidro, cloruro de potasio y ácido cítrico fueron obtenidos de J.T. BAKER. El reactivo 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH*), (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX) (97%) fueron obtenidos de Sigma Aldrich S. de R.L de C.V. El glicerol y. el ácido clorhídrico 1N fueron obtenidos de Merck. El quitosano grado alimenticio (GD 85%) con peso molecular de 280,000 – 350,000 fue adquirido de Vepinsa S.A de C.V. Para todas las pruebas se utilizó agua destilada.

5.2 MÉTODOS

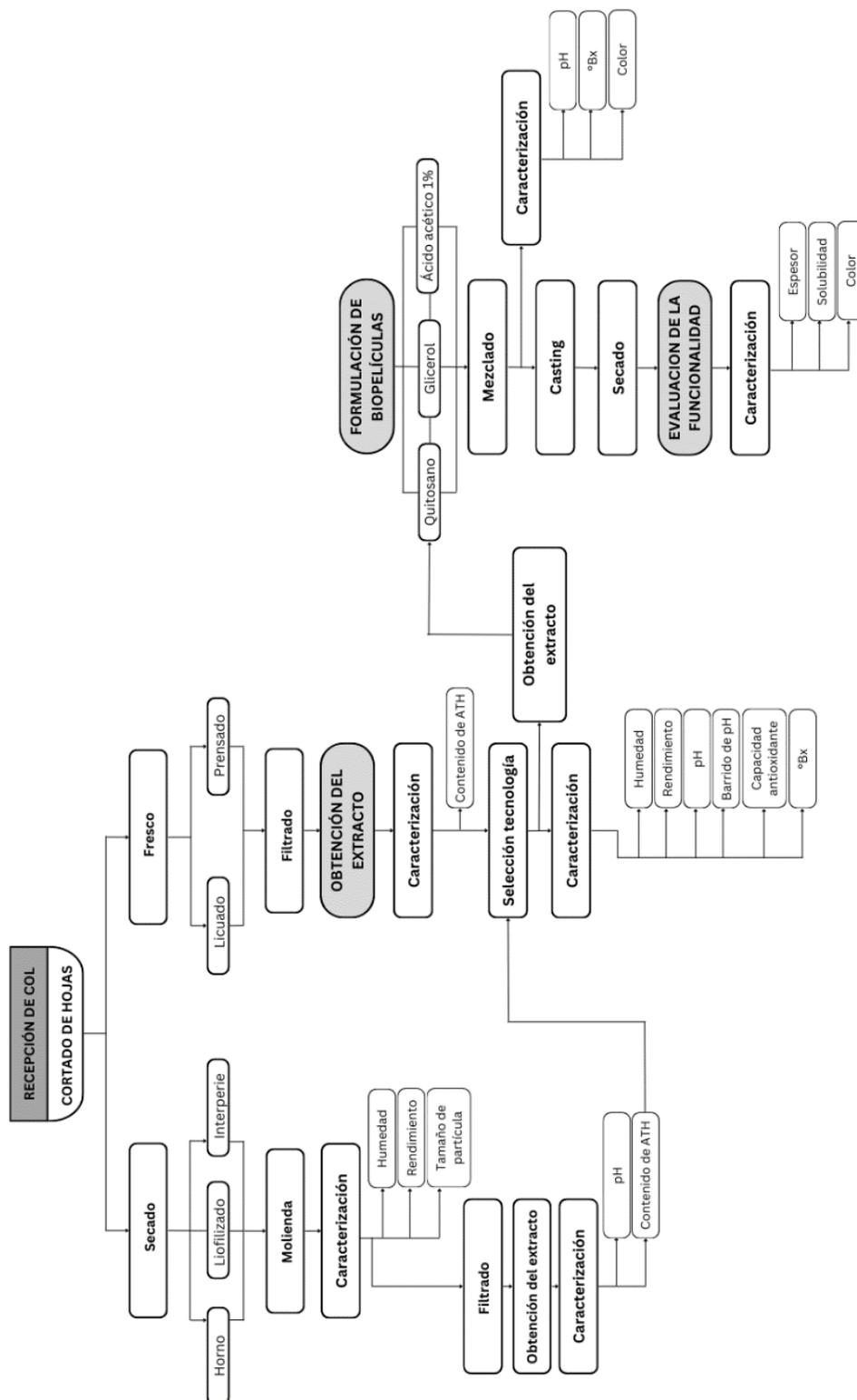


Fig. 4 Diagrama para la obtención del extracto a partir de col, formulación y evaluación de la funcionalidad de las biopelículas

5.2.1 ETAPA 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Las hojas de col morada fueron cortadas en fragmentos para posteriormente procesarlas secas y/o en fresco. Para la obtención del extracto sólido-líquido con la muestra seca se utilizó la metodología propuesta por (Pichardo Perez, 2019), con ligeras modificaciones, mientras que para obtener el extracto usando las hojas en fresco se utilizaron dos tipos de tecnologías, el prensado vertical y el licuado de estas.

5.2.1.1 Secado de la muestra

Para el secado de las hojas se utilizaron 3 tecnologías diferentes (horno de convección, liofilizado e intemperie) y una vez que las hojas estaban secas se trituraron con la ayuda de un molino eléctrico de aspas a pulsos Hamilton Beach 80350R hasta la obtención de un polvo fino al que se le determinó el contenido de humedad utilizando una termobalanza (100°C por 5min), rendimiento y distribución de tamaño de partícula mediante tamizado de acuerdo a la (*Página 173 - FARMACOPEA, s/f*) y posteriormente éste se protegió de la luz para su uso posterior.

5.2.1.1.1 En horno de convección

Se colocaron las hojas en un horno de convección San Son HCC a 40°C por 28 horas.

5.2.1.1.2 Por liofilizado

Los fragmentos de hojas fueron sometidos a -20°C usando un congelador Torrey CHTC-115D durante 24 horas previo a liofilizarlas en un Labconco por 25 horas.

5.2.1.1.3 A la intemperie

Las hojas se colocaron en charolas en el interior de la planta piloto de CIATEJ subsede Noreste, en donde la temperatura osciló entre 27-35°C y se dejaron secar durante 2 semanas con una humedad relativa de 21%.

5.2.1.2 Método de extracción a partir de pulverizado y hojas en fresco

Para la obtención de los extractos a partir de la muestra pulverizada de *B. oleracea* obtenidas previamente por secado en horno, liofilizado e intemperie se utilizó agua destilada como solvente en una proporción 1:20 p/v base seca, se dejó en agitación

constante por 3 min a 25°C y posteriormente se filtró usando papel filtro con un tamaño de poro de 5 µm (Ravanfar *et al.*, 2018).

Por otro lado, antes y después de procesar la muestra en fresco se le determinó la humedad y se utilizaron dos tecnologías diferentes para obtener el extracto, el licuado y el prensado. En la primera se colocaron las hojas en una licuadora Osterizer BLST4127013 con agua destilada a 25°C en una proporción 1:20 p/v base seca, la cual se determinó mediante pruebas previas, y se licuó durante 3 minutos; para la tecnología del prensado vertical, se utilizó un extractor de jugo Kuvings CS600S donde se colocaron las hojas y al igual que en el licuado, una vez que se obtuvo el extracto, éste se filtró usando papel filtro con un tamaño de poro de 5 µm. Para almacenar todos los extractos se dejaron a 10°C en frascos ámbar.

5.2.1.3 Caracterización química de los extractos

5.2.1.3.1 Cuantificación de antocianinas monoméricas

La cantidad de antocianinas contenidas en las muestras se cuantificaron a través del método de pH diferencial, siguiendo la metodología descrita por (Chandrasekhar *et al.*, 2012; Giusti & Wrolstad, 2001) con ligeras modificaciones. Se utilizó un buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M con pH de 1.0 y un buffer de acetato de sodio (CH₃CO₂Na) 0.4 M con pH de 4.5. Se tomarán 2 alícuotas del extracto a analizar, una alícuota se diluyó con el buffer pH 1.0 y la segunda se diluyó con el buffer pH 4.5, finalmente se realizó un barrido de 400 a 700 nm y se midió la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro.

5.2.1.3.2 Cuantificación de la capacidad antioxidante por DPPH*

Se realizó siguiendo la metodología descrita por (Brand-Williams *et al.*, 1995) con ligeras modificaciones. Para la curva patrón se utilizó una solución de TROLOX a distintas concentraciones (0.300 mM-0.0015 mM), usando metanol como blanco. Para caracterizar el extracto se tomaron 1950 µL de la solución de DPPH* (0.025 g/L) y se agregaron 50 µL de la muestra a analizar. Cada una de las reacciones se agitaron con vórtex y se mantuvieron en reposo durante 30 minutos en condiciones de obscuridad a temperatura ambiente. Por último, se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva

patrón con anterioridad como referencia para comparar los resultados que se obtuvieron con la prueba experimental.

5.2.1.3.3 Evaluación del color

Los diferentes tonos de color que se obtuvieron al someter el extracto a buffers de ácido cítrico concentrado en un rango de pH de 1-14, se evaluaron con un colorímetro HunterLab ColorFlex , se colocó en la celda 1ml de extracto con 2ml de buffer (Sánchez Aldana *et al.*, 2015). A partir de los parámetros L^* , a^* y b^* se calculó la diferencia total de color (ΔE), mediante la ecuación:

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

Donde ΔE es diferencia total de color, L^* es el grado de luminosidad, $(+a^*)$ es el enrojecimiento y $(-a^*)$ es verdor, $(+b^*)$ es amarillo y $(-b^*)$ es azul.

5.2.1.4 Selección de la tecnología para la obtención del extracto

Con base en la comparación de los resultados obtenidos en cuanto a la cantidad de antocianinas monoméricas de los extractos derivados a partir de los diferentes tipos de secado y métodos de extracción, se seleccionó el que mostró mayor concentración de éstas para incorporarse en la formulación y obtención de las biopelículas.

5.2.2 ETAPA 2. ELABORACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

5.2.2.1 Elaboración de las biopelículas

Para la formación de las biopelículas se adicionó quitosano, así como diferentes porcentajes del extracto de col morada (0, 1, 2 y 5 %) considerando su humedad, la cual, se determinó previamente mediante la metodología descrita en la A.O.A.C.23.003:2003. Para la elaboración de las biopelículas se usó el método propuesto por (Escobar, 2020) con ligeras modificaciones.

La formulación para cada biopelícula fue 1% quitosano, 1% glicerol y 98% de solución de ácido acético al 1%. Se formó una mezcla con 98.2 g de ácido acético y 0.9 g de quitosano

que se sometió a agitación constante de 150 rpm a 60° C por 75 minutos, después se enfrió a temperatura ambiente y se le agregó enseguida 0.9 ml de glicerol para dejarla en agitación por 15 minutos más. Posteriormente, se le añadió el extracto de col morada y una vez homogeneizada la solución se vertieron 53 ml en cajas Petri de 150 x 15mm. Las biopelículas se secaron en una estufa Novatech HS35-A10 a 45°C por 24 horas y luego fueron removidas de las cajas Petri con la ayuda de unas pinzas de disección cuidando de no romperlas.

5.2.3 ETAPA 3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS

5.2.3.1 Determinación del espesor

A las biopelículas obtenidas se les determinó el espesor usando un micrómetro digital ASIMETO ASI-116010 y siguiendo la metodología reportada por (Sánchez Aldana *et al.*, 2015) se cortaron 10 trozos de 2 x 3 cm de cada una, estos se colocaron uno sobre otro para tomar las medidas en distintos puntos de la superficie y el resultado se dividió entre el número de trozos sobrepuestos. Se realizó por triplicado.

5.2.3.2 Determinación de la solubilidad (S)

Se cortaron trozos de cada biopelícula con dimensiones de 2 x 2 cm, las cuales fueron secadas a 100 °C por 24 h hasta obtener un peso seco inicial (W_0) constante. Cada muestra se sumergió en 50 mL de agua destilada a una temperatura de 25°C por 24 h en agitación continua de 125 rpm (H. Dong *et al.*, 2020). Finalmente, las muestras fueron removidas de la inmersión con agua y secadas en horno a 100°C por 24h para obtener el peso seco final (W_2). Se tomaron triplicados de cada muestra de biopelícula para estimar los valores promedio, S se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$S (\%) = \left[\frac{W_0 - W_2}{W_0} \right] \times 100$$

5.2.3.3 Prueba de la eficiencia como indicador de pH

Se colocaron trozos de 2X2 cm cada biopelícula formulada con diferentes concentraciones de extracto (0, 1, 2 y 5%) en soluciones acuosas ajustadas con ácido cítrico para observar

visualmente el cambio de coloración al estar sometidas a valores de pH de 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 14.

5.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se analizaron con un ANOVA y una prueba Tukey de comparación de medias con una significancia estadística de $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

6.1 ETAPA 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

6.1.1 Evaluación de diferentes tipos de secado en la obtención de pulverizado de hojas
Con el objetivo de obtener la col con un contenido de humedad menor al 10% que facilitara la obtención del pulverizado se evaluaron 3 tipos de secado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, donde se observa que el método de secado que requirió menos tiempo fue el del horno de convección (28h), después el proceso de liofilizado (49h) y por último el secado a la intemperie (336h). Adicionalmente, se estimó el gasto energético requerido para el secado de un kilo de col fresca, el secado a la intemperie responde a una tendencia en el desarrollo de tecnologías sustentables por lo que no representó un gasto debido a que durante el proceso únicamente se requiere de radiación solar para que las moléculas de agua contenidas en las hojas se evaporaren, sin embargo, tanto el secado en horno de convección como el secado por medio del liofilizado de la muestra, tuvieron un gasto de 30 y 120.75 kw, respectivamente, siendo este último el mayor ya que se requiere de una etapa de congelado previo al liofilizado. Tal comparación proporciona un estimado en el costo de secado unitario y por supuesto, de cada método por lo cual, la diferenciación reside en los costos de la energía para realizar el proceso de secado, con tiempos menores y buenos rendimientos.

Tabla 1 Rendimiento en el proceso de secado por cada 1000g de col morada

Tipo de secado	Tiempo (h)	Cantidad de polvo obtenido		Composición		Gasto energético (kw)
		(g)	%	Humedad (%)	Sólidos (%)	
Horno de convección 40°C	28	106.66	10.66	8.66	91.34	30
Liofilizadora	49	67.64	6.76	5.33	94.67	120.75
Intemperie 27-35°C	336	95.95	9.59	9.01	90.99	0

Con base en los resultados presentados en la Tabla 1, el mejor método sería el secado en horno de convección, debido a que requiere de menos tiempo de secado, el rendimiento del polvo obtenido es mayor que las otras dos tecnologías empleadas, y aunque se requiere de un gasto energético en el proceso, éste representa una cuarta parte de lo que se gastaría

al emplear el liofilizado. Luego de que las hojas de col fueran secadas y trituradas mecánicamente, el polvo obtenido fue caracterizado mediante la determinación de su tamaño de partícula.

6.1.2 Caracterización del tamaño de partícula de los polvos obtenidos

La caracterización del pulverizado de las hojas se determinó mediante el tamizado de este. La Fig. 5 muestra la distribución granulométrica para los polvos obtenidos por los diferentes métodos de secado. Se observa que todas las partículas obtenidas mediante liofilizado tuvieron tamaños menores a 250 μm , el mayor porcentaje de retenido fue de 37% para los polvos entre 75 y 150 μm mientras que el 21% de partículas tuvieron un tamaño de 45 a 75 μm , para este rango de tamaño solo el 1% de las partículas obtenidas mediante el secado en intemperie y al horno lo alcanzaron, es decir, se lograron los menores tamaños de partículas con el liofilizado de las hojas.

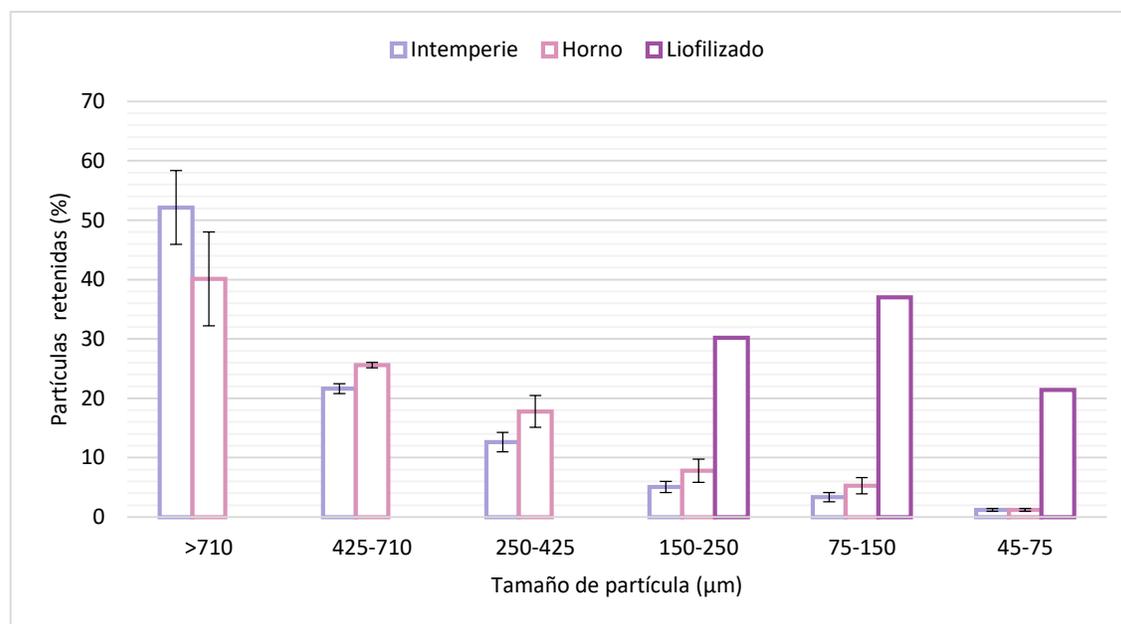


Fig. 5 Distribución del tamaño de partícula obtenido por tres métodos de secado diferentes (intemperie, horno y liofilizado)

El mayor porcentaje de partículas retenidas para el secado tanto en intemperie como en horno se presenta en tamaños de partícula mayores a 710 μm , 50 y 40% respectivamente, se observa, además, que a medida que disminuía el tamaño del tamiz el porcentaje de masa

retenida en las mallas de mayor diámetro también iba disminuyendo y se acumulaba hacia las de menor diámetro, lo que significa que el material se volvió más fino (Fig. 6).

Las principales diferencias entre la distribución granulométrica se deben al contenido de humedad alcanzado en cada una de las tecnologías empleadas, ya que existe una correlación entre el contenido de humedad y el tamaño de partícula, entre menor humedad, menor tamaño de partícula y viceversa (De La Cruz *et al.*, 2015). En el proceso de liofilizado se alcanza un menor porcentaje de humedad y se conserva mayor porosidad en la estructura de la materia vegetal, lo que facilita la obtención de tamaños de partículas más finas. Esta técnica consiste en congelar el producto y posteriormente remover el hielo por sublimación, aplicando calor en condiciones de vacío, se ha reportado que puede extraer hasta el 95% de agua contenida en alimentos y no afecta su estructura fisicoquímica, permitiendo su conservación (Radziejewska-Kubzdela y Biegańska-Marecik, 2015; Rajkumar *et al.*, 2017).

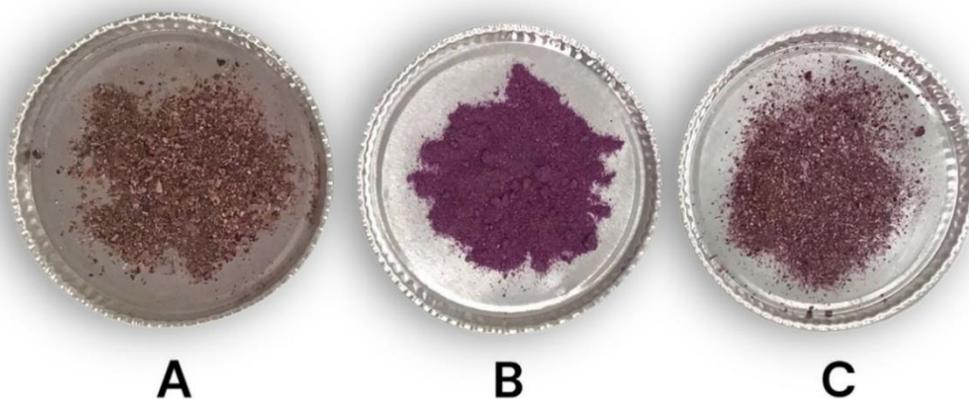


Fig. 6 Polvo obtenido a partir de la molienda de las hojas de col morada correspondientes al secado en intemperie (A), por liofilizado (B) y en horno (C).

El tamaño de partícula o granulometría es una característica física de sólidos muy significativa; entre mayor sea el tamaño de partícula del polvo menor es el área de contacto con el solvente, lo cual dificulta la extracción de los compuestos bioactivos. Por otra parte, si el lecho de partículas es demasiado fino, pueden presentarse los fenómenos de formación de grumos (De La Cruz *et al.*, 2015). Se deduce por lo afirmado anteriormente que el tamaño de partículas tiene una marcada influencia en los procesos de extracción de los

componentes bioactivos, de modo que, con base en los resultados, el método de secado que favorecería la mayor extracción de los compuestos bioactivos de las hojas de col morada en función del tamaño de partícula sería el liofilizado.

6.1.3 Obtención de extracto de col a partir de las hojas en fresco

Para la obtención del extracto de col a partir de sus hojas en fresco se utilizaron dos tecnologías diferentes, las cuales fueron licuado y prensado (Tabla 2), en las que se evaluó el tiempo de extracción, rendimiento, porcentaje de sólidos y el gasto energético empleado por cada 1000 g de hojas de col morada.

Tabla 2 Rendimiento en el proceso de extracción en fresco por cada 1000g de hojas de col morada

Tecnología	Tiempo (h)	Rendimiento (%)		Sólidos (%)	Gasto energético (kw)
		Bagazo	Extracto		
Licuado	1.25	38.5	61.5	13	0.87
Prensado	0.25	42.88	57.12	8	0.06

Se observa que con el licuado se obtiene un mayor rendimiento de extracción (61.5%) comparado con el prensado, sin embargo, el tiempo de obtención es 5 veces mayor, así como el gasto energético que se emplea para el desarrollo de esta tecnología. Considerando que el criterio decisivo para la elección de la tecnología empleada es el contenido de antocianinas, este se discute en la siguiente sección.

6.1.4 Determinación de antocianinas

La extracción es el primer paso para separar los productos naturales deseados de las materias primas, el método de extracción más eficiente debe maximizar la recuperación de los compuestos objetivo (Rebocho *et al.*, 2022). Las antocianinas son compuestos fenólicos que se encuentran en las hojas de la col morada como parte de sus metabolitos secundarios, para extraerlas se requiere del empleo de técnicas que permitan su recuperación sin comprometer sus propiedades bioactivas, la eficiencia de dicha extracción está en función de varios parámetros críticos como las propiedades del solvente, la luz, la duración del periodo de extracción, el pH, temperatura, tamaño de la partícula, relación sólido/líquido (Alara *et al.*, 2021), que deben ajustarse para evitar el daño oxidativo y proteger su capacidad antioxidante. En este sentido Gil-Martín *et al.*, (2022) mostró que el tiempo de

extracción es importante porque la exposición prolongada al oxígeno/luz puede deteriorar los fenoles y que la temperatura disminuye la viscosidad del solvente y la tensión superficial, mejorando la difusión y, por lo tanto, la tasa de transferencia de masa y la eficiencia de extracción. Sin embargo, las altas temperaturas pueden acelerar la degradación de las especies lábiles, reducir la capacidad antioxidante y producir la evaporación del solvente.

Para determinar la elección de la tecnología que sería empleada, además de considerar los rendimientos en los procesos del uso de las hojas en fresco y secas, así como el tamaño de partícula de los polvos obtenidos y el gasto energético que conlleva cada una, se evaluó el contenido de antocianinas totales por el método de pH diferencial, para ello, se hicieron extracciones bajo determinadas condiciones, encontrando que con el procesamiento de las hojas en fresco se obtienen mayores valores en el contenido de antocianinas en comparación con los extractos obtenidos usando el polvo seco de las hojas como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Contenido de antocianinas totales de los extractos obtenidos a partir de las diferentes tecnologías

Tecnología	Seco			Fresco	
	Horno (H)	Intemperie (I)	Liofilizado (L)	Licuado (F)	Prensado (P)
pH	5.26	5.09	5.70	5.94	5.45
Temperatura	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Sólido-Líquido	1:20	1:20	1:20	1:20	-
Tiempo (min) de contacto	3	3	3	3	-
Antocianinas totales (mg/L)	74.577	53.912	218.455	427.224	811.560
mg/gramo BS	3.252	1.175	4.850	4.272	5.791

En el procesamiento de las hojas por medio de su prensado se obtuvo que por cada gramo de base seca (BS) de col se extrajeron 5.791 mg de antocianinas, superando la concentración obtenida mediante el licuado de las mismas (4.272 mg/gr BS), en ambas tecnologías de extracción se logró la liberación de los metabolitos de la matriz vegetal debido al rompimiento de la membrana plasmática de las células vegetales por medio de la

trituration mecánica, sin embargo, para el licuado de las hojas se empleó agua como solvente para facilitar el proceso. La selección del solvente es crucial, se cree que los disolventes orgánicos suelen funcionar mejor en términos de extracción de antocianinas, algunos autores han utilizado etanol, metanol, acetona, o la mezcla de ellos (Dudnyk *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2015; Ravanfar *et al.*, 2018; Silva-Pereira *et al.*, 2015; Vo & Dang, 2019), no obstante, el agua es un solvente universal y debido a su polaridad las antocianinas son hidrosolubles en él. Galvão *et al.*, (2020) reportó que el agua posee una eficiencia de extracción mucho mayor que los alcoholes debido a su alta constante dieléctrica. La selección de cualquier solvente para fines de extracción debe basarse en los siguientes factores: polaridad, temperatura de ebullición, reactividad, viscosidad, estabilidad, seguridad y costo (Q. W. Zhang *et al.*, 2018). La efectividad de la extracción proviene de la interacción entre la capacidad de solubilización del solvente y la solubilidad relativa de los compuestos fenólicos de la muestra, lo que determina su coeficiente de distribución y extractabilidad. De modo que, la capacidad de los solventes para establecer puentes de hidrógeno es determinante, específicamente para lograr la solvatación y liberación de las especies unidas a la matriz vegetal. Por lo tanto, cuanto mayor sea la difusividad del solvente dentro de la matriz, más fácil será la desestabilización de la red de enlaces de hidrógeno dentro de su estructura y mayor será la solvatación de los compuestos objetivo (Gil-Martín *et al.*, 2022).

Así como en el licuado de las hojas, para obtener los extractos a partir del pulverizado de las hojas también se usó agua considerando los mismos parámetros operativos (temperatura a 25°C, relación 1:20 sólido-líquido y tiempo de contacto de 3 min) como se presenta en la Tabla 3. Para las hojas secas se utilizó la maceración como método de extracción, proceso por el cual se remojó la muestra en el solvente, seguido de una agitación constante y de la separación de las partes sólidas mediante su filtración (Alara *et al.*, 2021), las antocianinas se disuelven con el agua y se difunden fuera de la matriz con los solutos extraídos, cualquier factor que aumente la difusividad y la solubilidad, mejora la extracción, (Zhang *et al.*, 2018), en este sentido, el pretratamiento de secado y molienda que se le dio a las hojas previo a la extracción, facilitó la liberación de compuestos, ya que las muestras

secas o liofilizadas disminuyen la oxidación de las hojas, su degradación térmica y los cambios bioquímicos (Martín *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de considerar estas condiciones, los valores del contenido de antocianinas presentes en los polvos fueron menores comparándolos con el tratamiento en fresco de las hojas, excepto por el extracto a partir de las hojas liofilizadas (4.850 mg/gr BS), que superó los valores obtenidos por medio del licuado. El extracto a partir de las hojas secas en horno tuvo una concentración de 3.252 mg/gr BS, mientras que el polvo de hojas secas en intemperie tuvo la menor concentración de antocianinas (1.175 mg/gr BS) por lo que se infiere que debido a su exposición continua a la luz se ocasionó su degradación. Cabe mencionar que el valor promedio del pH de los extractos fue de 5.48, la extracción de antocianinas generalmente se realiza a pH bajo debido a que en ambientes ácidos estos compuestos adoptan la forma neutra, que es la más adecuada para ser solubilizados (Gil-Martín *et al.*, 2022).

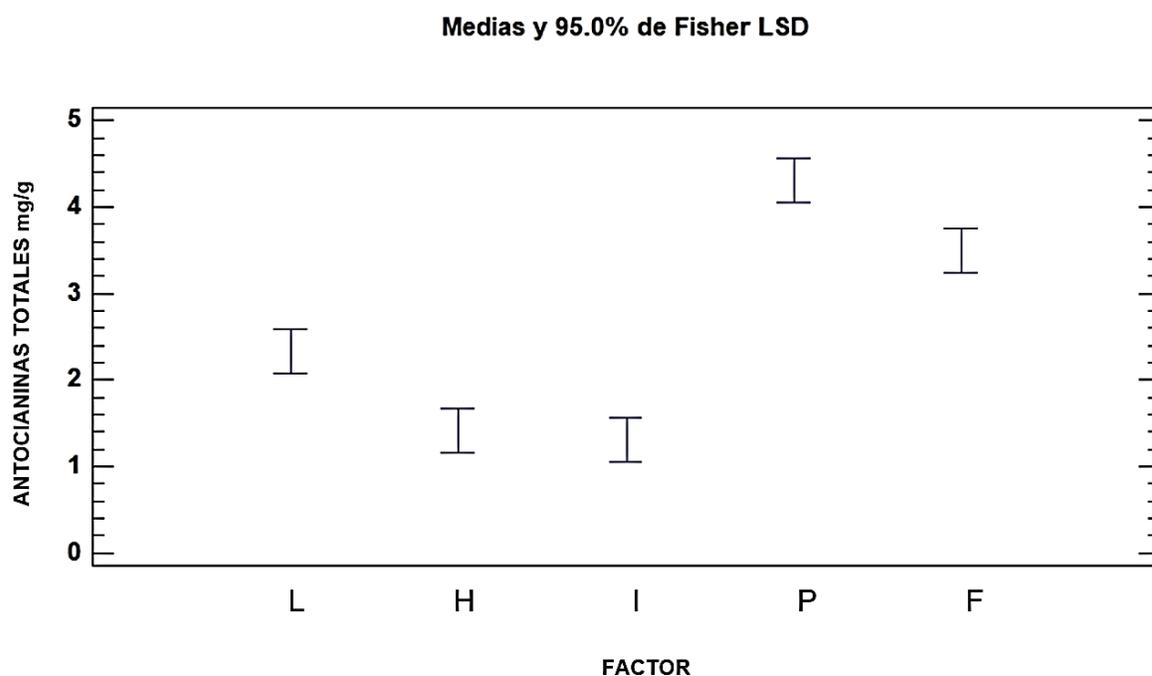


Fig. 7 Comparación de medias del contenido de antocianinas entre las diferentes tecnologías de extracción. L (liofilizado), H (horno), I (intemperie), P (prensado), F (licuado).

Estadísticamente se realizó un análisis de medias con un 95% de confianza, se encontró que no hay diferencias significativas entre el contenido de antocianinas totales obtenido mediante el secado de las hojas de col morada usando horno e intemperie, sin embargo, el

análisis confirmó que la mejor tecnología para extraer antocianinas en col morada es el prensado de sus hojas en fresco, seguido del licuado de estas (Fig. 7). Estos valores en la concentración del prensado coinciden con lo reportado por Pichardo Perez (2019), quien obtuvo 5.39 mg/gr BS en la extracción de antocianinas en col morada, pese a ello, requirió liofilizar la muestra y hacer una extracción con agua por medio de la sonicación de la solución durante 20 min, lo cual, con el empleo de dicha tecnología se incrementan los costos de extracción, así como el tiempo; otra de las tecnologías que se han aplicado para llevar a cabo extracciones en col morada es la asistida por microondas (Netramai *et al.*, 2020) y ultrasonido, Ravanfar *et al.* (2018) utilizó una solución acuosa a 15°C en proporción 1:6 con el polvo de hojas de col liofilizadas obteniendo una concentración de antocianinas de 0.36 mg/g BS usando pulsos eléctricos durante 90 min, concentración muy por debajo de la obtenida con el prensado de la hoja fresca, también Galvão *et al.*, (2020) mediante el macerado en agua por 3 hrs de las hojas secas en una proporción 1:60 obtuvo una concentración menor, de 2.48 mg/g BS. Algunos otros autores han reportado el uso de solventes hidroalcohólicos para la extracción de antocianinas obteniendo concentraciones incluso menores que las que se alcanzaron utilizando las hojas secas en intemperie, tal es el caso de Chandrasekhar *et al.* (2012) quien obtuvo 0.762 mg/g BS en su tratamiento. Como se mencionó anteriormente, la misma interacción del solvente con la antocianinas puede propiciar su degradación, así como el procesamiento de la muestra y su exposición a diferentes condiciones externas como la luz o la temperatura, el prensado de las hojas en fresco de la col implican una sola operación con lo que se mantienen mejor los compuestos fitoquímicos, comparando los resultados del rendimiento de extracción, el gasto energético y el contenido de antocianinas se encontraron mejores valores (5.791 mg/g BS) usando la planta fresca en comparación cuando se usó seca, por lo tanto se decidió obtener los extractos usando el prensado de las hojas para las pruebas posteriores.

6.1.5 Capacidad antioxidante

Una vez elegidas las condiciones de extracción, se obtuvieron los extractos de las hojas de col morada por medio de su prensado en fresco y se les determinó la capacidad antioxidante a través del método DPPH*, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Los compuestos fenólicos como lo son las antocianinas tienen una importante contribución a la capacidad antioxidante de los alimentos que las contienen, el DPPH^{*} es un radical libre estable que posee un color púrpura intenso, que cambia de color a amarillo con su eliminación, por lo tanto, es posible cuantificar la capacidad de los antioxidantes al extinguir el radical DPPH^{*} (Rebocho *et al.*, 2022).

Tabla 4 Capacidad antioxidante por DPPH^{*} en extractos de *B. oleracea* obtenidos con el prensado de sus hojas en fresco

DPPH [*]	
TEAC (mmol/g)	% Inhibición
4.95 ± 0.015	22.59 ± 0.03

*TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de TROLOX). Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3

Debido a la carga positiva de las antocianinas, el número y la disposición de los grupos hidroxilo aromáticos, el grado de conjugación estructural y la presencia de sustituyentes donadores y atractores de electrones en la estructura del anillo que las conforma, las convierte en donadores de hidrógeno muy eficaces para compuestos altamente reactivos como el radical libre de DPPH^{*} y, por lo tanto, previenen la formación de más radicales. Este efecto protege a las células del daño oxidativo, que conduce al envejecimiento y a diversas enfermedades, como cáncer, enfermedades neurológicas y cardiovasculares, inflamación, diabetes e infecciones bacterianas (Martín *et al.*, 2017).

En un estudio llevado a cabo por Pichardo Perez (2019) se reportó una concentración de 4.05 mmol TEAC/g de muestra liofilizada de col morada utilizando solventes hidroalcohólicos y un baño ultrasónico como método de extracción, mostrando una concentración menor comparada con los resultados obtenidos con las condiciones de extracción probadas.

6.1.6 Evaluación del color de los extractos por colorimetría

Se caracterizó el extracto en función de su colorimetría, se obtuvieron diferentes tonalidades de coloración dependiendo del pH al que se sometió al añadirle buffer de ácido cítrico, las cuales iban desde rojo para pH 1 hasta amarillo para pH 14 como se muestra en la Fig. 8, esto debido a las propiedades hiperocrómicas y batocrómicas de las antocianinas,

coincidiendo con lo reportado por Abedi-Firoozjah *et al.*, (2022) donde la coloración fue desde el rojo a pH 1-2, rosa a pH 3, violeta a pH 4-6, azul a pH 7-8, verde a pH 9-11 hasta amarillo a pH 12. Con estos resultados podemos constatar si las biopelículas conservan el mismo comportamiento en los cambios evaluados en el extracto.

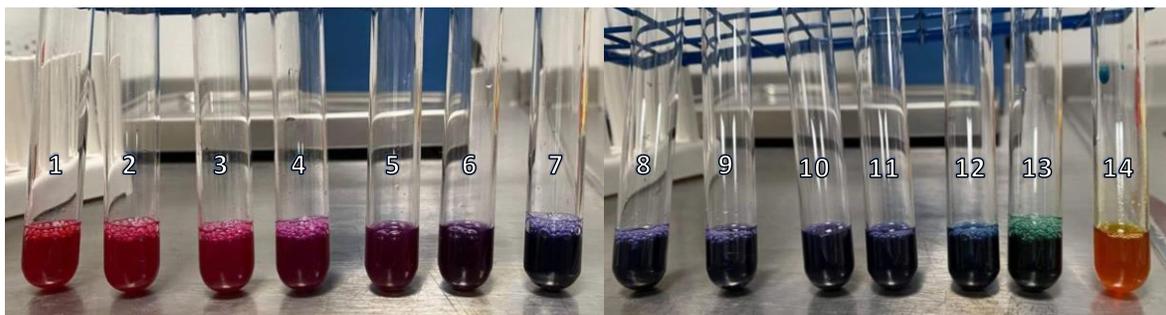


Fig. 8 Tonos obtenidos por la adición de buffer de ácido cítrico al extracto de col morada en valores de pH 1-14

Las antocianinas reflejan la luz en el rango rojo-azul en el espectro visible y tienen propiedades fisicoquímicas características que les confieren su color y estabilidad únicos, son moléculas altamente reactivas y, por lo tanto, sensibles al pH debido a la naturaleza iónica de su estructura (Martín *et al.*, 2017), son anfóteras y forman sales con ácidos o bases. Al ser flavonoides se constituyen de un anillo C heterocíclico que contiene átomos de oxígeno, con dos anillos aromáticos A y B unidos a él, y se encuentran en cuatro formas químicas diferentes, que dependen del pH de la solución. Así, en un ambiente ácido, a pH 1, las antocianinas se encuentran en forma de catión flavilio (color rojo/púrpura) lo que las hace muy solubles en agua, cuando el pH aumenta entre 2 y 4, la especie azul quinoidal se encuentra abundantemente, mientras que a pH entre 5 y 6 aparece la pseudobase de carbinol y una chalcona, compuestos que son incoloros. Finalmente, a un pH superior a 7, las antocianinas se degradan según los grupos sustituyentes, son inestables y generan un color amarillo verdoso como resultado de la formación de chalconas. Sin embargo, las cuatro formas de antocianinas pueden coexistir en un rango de pH de 4-6, y el catión flavilio mantiene el equilibrio de estas formas (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2022; Enaru *et al.*, 2021). Los sustituyentes del anillo B son los responsables de su estabilidad e intensidad y tipo de color de las antocianinas, si hay metilación el enrojecimiento aumenta así como su estabilidad, en cambio cuando hay más grupos hidroxilo presentes, el color se torna azulado y la

estabilidad disminuye (Jiang y Zhang, 2023; Martín *et al.*, 2017). Por otro lado, aunque en un ambiente neutral, las agliconas no son estables, los derivados de monoglucósidos y diglucósidos son más estables en estas condiciones, porque las moléculas de azúcar evitarán la degradación de intermediarios inestables en moléculas de fenol y ácido aldehído (Enaru *et al.*, 2021).

Tabla 5 Valores de las variables L*, a*, b* y ΔE del extracto obtenido a diferentes valores de pH

pH	L*	a*	b*	ΔE
1	30.14±0.13	49.42±0.08	5.75±0.34	45.65
2	30.47±0.06	47.26±0.05	-1.70±0.07	43.38
3	30.19±0.06	12.52±0.78	-6.18±0.52	33.93
4	37.35±0.18	25.98±0.24	-13.59±0.08	35.85
5	36.50±0.47	20.03±0.50	-16.02±0.33	6.51
6	37.58±0.41	12.48±0.29	-16.88±0.27	33.99
7	36.14±0.64	2.91±0.06	-18.76±0.54	34.45
8	34.17±0.16	3.40±0.06	-19.40±0.13	33.04
9	34.71±0.16	2.47±0.00	-19.61±0.18	33.81
10	35.00±0.24	-0.54±0.07	-19.70±0.12	34.93
11	32.53±0.27	-4.14±0.10	-21.66±0.13	35.46
12	32.78±0.16	-14.46±0.11	-20.26±0.04	40.31
13	40.37±0.09	-26.66±0.18	21.94±0.02	55.04
14	46.80±0.06	4.19±0.17	64.74±0.06	77.40

En la Tabla 5 se presentan los resultados de la evaluación colorimétrica tomando en cuenta los atributos de color donde L* indica el grado de luminosidad, la coordenada a* en valores positivos indica la presencia de tonalidades rojas mientras que, en los negativos de tonalidades verdes, y la coordenada b* con valores positivos indica tonalidades amarillas y azules cuando estos son negativos.

El extracto obtenido a partir del prensado de las hojas de *B. oleracea* en fresco presentó un valor cercano a la neutralidad con pH de 5.45 con parámetros colorimétricos de L* entre 36.50 ± 0.47 y 37.58 ± 0.41 que visualmente corresponde a una tonalidad azul/púrpura, al someterlo a la solución con valores de pH menores a 5 se obtuvo una luminosidad en un rango de 30–37 y coloraciones rojas coincidentes con los valores positivos en la coordenada a*, en comparación con los valores de pH de 13 y 14 donde se alcanzaron valores mayores a 40 en la luminosidad, lo que indica que el extracto presenta mayor brillo y tendencia al blanco conforme incrementan los valores de pH. Al incrementar el pH a partir de 10, los parámetros colorimétricos respecto a la coordenada a* comenzaron a ser negativos presentando tonalidades verdosas y amarillas, mientras que para la coordenada b*, los resultados muestran que el extracto con valores de pH entre 2-12 tendieron a tener una coloración azul ya que sus valores fueron negativos, sin embargo, en presencia de buffer con pH 1, 13 y 14 el extracto indicó la presencia de tonalidades amarillas. En cuanto a ΔE , es una medida que juega un papel importante en la evaluación de la precisión del color ya que cuantifica la diferencia entre dos colores, el estándar que en este caso fue el extracto sin buffer, y el obtenido para cada valor de pH. Indica la diferencia de color total en una escala de 0 a 100, donde 0 es menos diferencia de color y 100 indica una distorsión completa (Enaru *et al.*, 2021), de acuerdo a la Tabla 5, todas las tonalidades son diferentes a la obtenida en el extracto, sin embargo, los rangos de pH que presentan mayor diferencia son 1-2 y 12-14, correspondientes a tonalidades rojas y verdes/amarillas, respectivamente, lo cual confirma que las antocianinas en medios muy ácidos tienen presente el catión flavilio y en medios muy básicos, las chalconas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Freitas *et al.* (2020), quien menciona las variaciones de color que obtuvo en extractos hidroalcohólicos de hojas de col morada, a valores de pH por debajo de 2, las tonalidades que tuvo fueron rojizas para valores de pH entre 4-9 y conforme aumentaba el pH estas viraban de azul a verde y amarillo, de igual manera Arafa *et al.* (2021) determinó visual y espectrofotométricamente las coloraciones de extractos de *Brassica oleracea* donde también se aprecia una transición de tonalidades rojizas a verdosas conforme el medio ácido se alcaliniza.

6.2 ETAPA 2. ELABORACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS

A la solución formadora de biopelículas (compuesta por quitosano, glicerol y ácido acético) se le añadieron tres concentraciones diferentes de extracto de col morada obtenido a partir del prensado de sus hojas en fresco (1, 2 y 5%), previo a formar las biopelículas usando la técnica de casting. La solución líquida fue caracterizada, por lo que se le midió el pH, °Brix y color. Los parámetros de color (a^* , b^* , L^* y ΔE) obtenidos de las mediciones de la solución formadora de biopelículas se muestran en la Tabla 6, el valor de luminosidad (L^*) cambió en función del porcentaje de extracto añadido, por lo que tiende a presentar opacidad a mayor concentración.

Para las cuatro formulaciones el valor de la coordenada a^* fue positivo, mientras que para la coordenada b^* negativo, por lo que la solución formadora de biopelículas tuvo tendencia a tonalidades rojas y azules, lo que concuerda de igual manera con las tonalidades púrpura que adquirió el extracto con valores de pH 4. La solución sin extracto era transparente, al calcular ΔE se reafirma la diferencia total de color que había entre las soluciones sin extracto y las que sí tenían, por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de ΔE para las soluciones con 2 y 5% de extracto añadido, es decir, entre ellas no hubo una diferencia visual en la tonalidad que adquirieron al añadirles el extracto.

Tabla 6 Caracterización de la solución formadora de biopelículas

% de extracto	pH	°Bx	Color			ΔE
			L^*	a^*	b^*	
0	2.00	1	7.31 ± 0.02	10.57 ± 0.02	-1.53 ± 0.02	-
1	4.05	3	25.32 ± 0.02	31.59 ± 0.08	-16.12 ± 0.08	76.24 ± 0.23^a
2	4.17	4	14.04 ± 0.04	36.17 ± 0.31	-16.52 ± 0.51	87.92 ± 0.32^b
5	4.23	5	5.43 ± 0.12	22.29 ± 0.45	-0.18 ± 0.08	87.79 ± 0.77^b

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar, n=3

Considerando que la solución formadora de biopelículas adquirió la tonalidad del extracto que se le añadió y que se probó que dicho extracto contiene antocianinas que tienen sensibilidad hacia las variaciones de pH ambientales en las que se encuentren, se esperaba que la biopelícula formada a partir de estas soluciones conservase las propiedades evaluadas anteriormente. En este sentido, el color natural de las biopelículas sería el indicador del viraje del pH del medio en el que se encuentre, tal como lo reportado por

Zhang *et al.*, (2014) quienes elaboraron biopelículas indicadoras de pH por medio de extractos de *Bauhinia blakeana* Dunn.

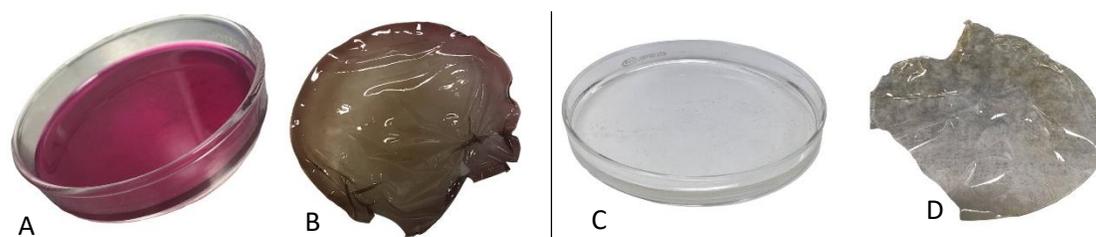


Fig. 9 Obtención de biopelículas por casting. A. Solución formadora de biopelículas con la adición de extracto de col morada. B. Biopelícula con extracto. C. Solución formadora de biopelículas sin adición de extracto. D. Biopelícula de quitosano sin extracto

6.3 ETAPA 3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS

6.3.1 Caracterización de las propiedades físicas de las biopelículas

Las biopelículas obtenidas presentaron ausencia de roturas y fracturas después del secado, así como de partículas insolubles o áreas de opacidad por lo que se pudieron manipular sin riesgo de rotura.

La solubilidad de las biopelículas es un indicador de la resistencia que tiene como recubrimiento cuando se expone a un medio que contenga agua o humedad (Serrano *et al.*, 2022), una mayor solubilidad de las biopelículas puede indicar una menor resistencia al agua, provocando su disolución y perdiendo su efecto protector sobre la superficie del alimento, en este sentido, la biopelícula que en su formulación no contenía extracto de col morada presentó una solubilidad del 58%, menor a los valores que presentaron las biopelículas adicionadas con extracto, dentro de las cuales, las biopelículas con 2% de extracto tuvieron un porcentaje de solubilidad del 63% y las de 1% del 65%, con lo cual se obtuvo que no hubo diferencias significativas en las propiedades físicas de ambas biopelículas entre sí, sin embargo, con respecto a la formulación con 5% de extracto sí las hubo, ya que estas biopelículas tuvieron un 74% de solubilidad, por lo que, considerando las tres formulaciones evaluadas fueron las que tuvieron menor resistencia al contacto con agua, es decir, las que tardarían menos en disolverse en un ambiente húmedo (Tabla 7).

Dependiendo de la aplicación que se tenga en mente para las biopelículas son preferibles valores de solubilidad mayores o menores, en este caso existen dos factores que la

determinan, el quitosano y el extracto de col morada, Yoshida *et al.* (2014) obtuvieron valores de solubilidad para sus biopelículas elaboradas a base de quitosano con extracto de uvas cercanos a 0%, atribuidos a la polimerización de todas las moléculas de quitosano y su interacción electrostática con las moléculas de las antocianinas, dando como resultado menos sitios disponibles para la absorción de agua en la matriz polimérica.

Las biopelículas con extracto obtuvieron porcentajes de solubilidad proporcionales a la concentración de flavonoides que se les añadió. Podría deberse a la naturaleza hidrófila de los flavonoides añadidos. Los grupos hidroxilo presentes en las moléculas de flavonoides son capaces de elevar la capacidad de unión de las películas con agua, aumentando así la solubilidad de las películas compuestas. Varios investigadores informaron resultados similares, Abedi-Firoozjah *et al.* (2022) reportaron que la adición de extracto de col morada en biopelículas aumentan la solubilidad debido a la naturaleza hidrofílica de las antocianinas, así como sus procesos de acilación y glicosilación, además también se ve influenciada por la solubilidad del quitosano y la distribución de sus grupos amino, su peso molecular y el grado de acetilación que se use para elaborar las biopelículas.

El espesor de las biopelículas añadidas con extracto osciló entre 0.093 y 0.098 mm, siendo la biopelícula sin extracto la más delgada como se muestra en la Tabla 7, con lo cual sobresale la uniformidad de las películas obtenidas. El grosor afecta las propiedades mecánicas principalmente la resistencia a la ruptura y la permeabilidad al vapor de agua, generalmente entre más gruesas son más resistentes (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2022), por lo tanto, se esperaría que la resistencia incremente en comparación a la biopelícula sin extracto ya que los valores del espesor aumentaron cuando le fue añadido el extracto.

Tabla 7 Caracterización de las propiedades físicas de las biopelículas

% de extracto	Espesor (mm)	Solubilidad %
0	0.047 ± 0.07 ^a	58 ± 2.10 ^d
1	0.093 ± 0.23 ^b	65 ± 1.61 ^e
2	0.091 ± 0.21 ^b	63 ± 1.62 ^e
5	0.098 ± 0.01 ^c	74 ± 4.95 ^f

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3

Se ha reportado que la adición de flavonoides aumenta el espesor de las biopelículas debido a que los múltiples grupos hidroxilo en las antocianinas pueden unir varias moléculas de quitosano al actuar como puente y reducir la distancia intermolecular, produciendo estructuras más compactas. Además, en algunos estudios se ha concluido que la cantidad y el tipo de compuestos fenólicos afectan el espesor, tal es el caso de Sutharsan *et al.*, 2022, donde compararon las propiedades fisicoquímicas de biopelículas de quitosano adicionadas con flavonoides como luteolina, quercerina y catequina y obtuvieron un espesor entre 0.049 y 0.08 mm para sus biopelículas, recalando que este aumentaba conforme a la concentración que añadían.

6.3.2 Evaluación de la funcionalidad de la biopelícula como indicador de pH

La funcionalidad de las biopelículas adicionadas con extracto de col morada en concentraciones de 0, 1, 2 y 5% se evaluó respecto al cambio visual en su coloración a través de su inmersión en soluciones tampón con diferentes valores de pH (1, 3, 4, 7, 9, 11 y 13) como se muestra en la Fig. 10. Se observó que la biopelícula sin extracto no fue sensible a los valores de pH de las soluciones. En cambio, las biopelículas con concentraciones de 1, 2, y 5% de extracto añadidos presentaron un cambio de color en menos de 60 s, para las formulaciones con 2 y 5% estos cambios fueron más evidentes en comparación con la formulación con 1% de extracto, por lo que se considera que las biopelículas con concentraciones a partir del 2% de extracto son funcionales como indicadores de pH. También puede apreciarse que los tonos varían en intensidad, pero no en color dependiendo del porcentaje de extracto de col adicionado en la biopelícula. A medida que aumenta el porcentaje de extracto de col en las biopelículas aumenta la intensidad en el tono. Con base en las imágenes obtenidas podemos ver que un porcentaje de 1% presenta una tonalidad tenue que podría no ser suficiente para detectar los cambios de pH en un producto alimenticio, a diferencia del 2 y 5%.

La coloración de estas películas podría atribuirse a la transformación en la estructura química de las moléculas de antocianinas con respecto a los valores de pH de la solución. A pH 1, las biopelículas muestran un color rojizo, y cambia notablemente su color de rojizo a azul a medida que el pH aumenta a 7, pero cambia a verde a pH 9. Con un aumento de pH a 13, estas biopelículas se vuelven amarillo verdoso rápidamente. Los cambios de color vívidos de las películas preparadas frente a los valores de pH han permitido sus aplicaciones como indicadores de pH en el envasado inteligente de alimentos tales como carne de cerdo, leche, pescado, camarón o salchicha (Dudnyk *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2015; Silva-Pereira *et al.*, 2015; Vo & Dang, 2019; Wardana & Widyaningsih, 2018) .

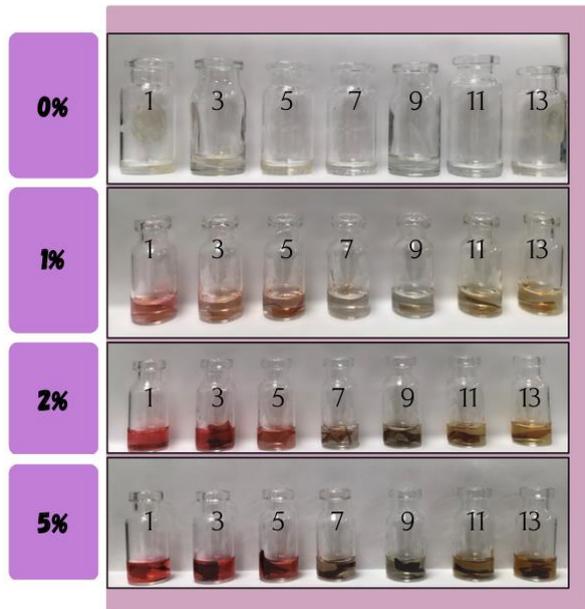


Fig. 10 Cambio visual en la coloración de las biopelículas con concentraciones de extracto de col morada (0, 1, 2 y 5%) sometidas a buffer de ácido cítrico con diferentes valores de pH

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

El prensado de las hojas de col en fresco fue el mejor método de extracción con base en todos los parámetros evaluados (gasto energético, tiempo de extracción y contenido de antocianinas), se alcanzó una concentración de antocianinas de 5.791 mg/g BS con propiedad antioxidante (4.95 ± 0.015 TEAC mmol/g).

Se obtuvieron biopelículas a base de quitosano, glicerol y ácido acético por el método de casting y usando esta formulación también se obtuvieron biopelículas adicionadas con extracto de col morada usando diferentes concentraciones (1,2 y 5% v/v).

Con la adición del extracto a las biopelículas se modificaron sus propiedades físicas, se tuvieron menores porcentajes de solubilidad y un aumento en su espesor.

Las biopelículas adicionadas con extracto de col morada conservaron el mismo comportamiento que los extractos al presentar un cambio de color respecto al pH de la solución en la que se encontraban. Los virajes de color fueron más visibles a partir del 2% de extracto añadido.

La transformación en la estructura química de las moléculas de las antocianinas extraídas fueron las responsables del viraje colorimétrico mostrando diferentes tonalidades, rojas, azules y verdes/amarillas.

Las biopelículas adicionadas con extracto obtenido a partir del prensado de hojas *de B. oleracea* en fresco tienen potencial para ser aplicadas como recubrimiento de alimentos, permitiendo al consumidor conocer el estado de estos a través de su sensibilidad a los cambios de pH.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Es conveniente realizar el análisis de sus propiedades mecánicas como el porcentaje de elongación y resistencia a la ruptura, así como su caracterización fisicoquímica en función de conocer la permeabilidad al vapor de agua y a gases, el estudio de sus isothermas de sorción, biodegradabilidad y colorimetría.

También se recomienda realizar estudios para la protección y estabilización de color de las antocianinas obtenidas de *B. oleracea* y así potenciar su posible aplicación en productos hortofrutícolas o cárnicos realizando pruebas de vida de anaquel.

Finalmente, se debe hacer una evaluación técnico-financiera del proceso para la obtención de los extractos, formulación de las biopelículas y aplicación, así como su optimización.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

- Alizadeh-Sani, M., Mohammadian, E., Rhim, J. W., & Jafari, S. M. (2020). pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. *Trends in Food Science and Technology*, 105(August), 93–144. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.014>
- Alves, V. D., Mali, S., Beléia, A., & Grossmann, M. V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 941–946. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.007>
- Andretta, R., Luchese, C. L., Tessaro, I. C., & Spada, J. C. (2019). Development and characterization of pH-indicator films based on cassava starch and blueberry residue by thermocompression. *Food Hydrocolloids*, 93(January), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.019>
- Arafa, A. A., Nada, A. A., Ibrahim, A. Y., Sajkiewicz, P., Zahran, M. K., & Hakeim, O. A. (2021a). Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1820–1831. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.167>
- Arafa, A. A., Nada, A. A., Ibrahim, A. Y., Sajkiewicz, P., Zahran, M. K., & Hakeim, O. A. (2021b). Preparation and characterization of smart therapeutic pH-sensitive wound dressing from red cabbage extract and chitosan hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1820–1831. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.05.167>
- Argüello-García, E., Solorza-Feria, J., Rendón-Villalobos, J. R., Rodríguez-González, F., Jiménez-Pérez, A., & Flores-Huicochea, E. (2014). *Properties of Edible Films Based on Oxidized Starch and Zein*. <https://doi.org/10.1155/2014/292404>
- Arrieta, Á., Durango, L., & Arizal, E. (2018). Estudio de las propiedades absorbentes de un biopolímero a base de almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Espacios*, 39(53), 15.
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O., & Srinivasa Gopal, T. K. (2015). Smart packaging systems for food applications: a review. En *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 52, Issue 10, pp. 6125–6135). <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1766-7>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cardoso, L. M., Dias Novaes, R., Aparecida De Castro, C., Novello, A. A., Gonçalves, R. V., Ricci-Silva, M. E., Josué De Oliveira Ramos, H., Do, M., Peluzio, C. G., Paulo, J., & Leite, V. (2015). Chemical composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice. *Nutr Hosp*, 32(2), 702–709. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.8885>

- Carvalho, V. V. L., Gonçalves, J. O., Silva, A., Cadaval, T. R., Pinto, L. A. A., & Lopes, T. J. (2019). Separation of anthocyanins extracted from red cabbage by adsorption onto chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *131*, 905–911. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.03.145>
- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(4), 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.004>
- Chang, C. J., Chandrasekar, J., Cho, C. J., Venkatesan, M., Huang, P. S., Yang, C. W., Wang, H. T., Wong, C. M., & Kuo, C. C. (2023). Reinforcing a Thermoplastic Starch/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Composite Foam with Polyethylene Glycol under Supercritical Carbon Dioxide. *Polymers*, *15*(1). <https://doi.org/10.3390/polym15010129>
- Chigurupati, N., Saiki, L., Gayser, C., & Dash, A. K. (2002). Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. *International Journal of Pharmaceutics*, *241*(2), 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00246-6)
- Choudhury, A. K. R. (2014). Using instruments to quantify colour. En *Principles of Colour and Appearance Measurement* (pp. 270–317). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857099242.270>
- Cortés, J. F., Fernández, A. L., Mosquera, S. A., & Velasco, R. (2014). Evaluación de propiedades mecánicas, ópticas y de barrera en películas activas de almidón de yuca. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *12*(1), 88–97. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612014000100011&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n1/v12n1a11.pdf
- Crini, G. (2022). Historical résumé. *Chitin and Chitosan*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96119-6.00002-5>
- Damant, A. P. (2011). Food colourants. *Handbook of Textile and Industrial Dyeing*, 252–305. <https://doi.org/10.1533/9780857094919.2.252>
- De La Cruz, N., Arroyave, T., Felipe, A., Cárdenas, C., Fernando, L., & Giraldo, G. (2015). Análisis y modelamiento de la granulometría en la cáscara del café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo. *Producción + Limpia*, *10*(2), 80–91.
- Dong, H., Ling, Z., Zhang, X., Zhang, X., Ramaswamy, S., & Xu, F. (2020). Smart colorimetric sensing films with high mechanical strength and hydrophobic properties for visual monitoring of shrimp and pork freshness. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *309*(October 2019), 127752. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127752>
- Dong, Y., Li, Y., Ma, Z., Rao, Z., Zheng, X., Tang, K., & Liu, J. (2023). Effect of polyol plasticizers on properties and microstructure of soluble soybean polysaccharide edible films. *Food Packaging and Shelf Life*, *35*, 101023. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2022.101023>

- Dudnyk, I., Janeček, E. R., Vaucher-Joset, J., & Stellacci, F. (2018). Edible sensors for meat and seafood freshness. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 259, 1108–1112. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.057>
- Dutta, P. K., Duta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63(1), 20–31.
- Enaru, B., Drețcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. En *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10121967>
- Enríquez, M., Velasco, R., & Ortiz, V. (2011). Composición y procesamiento de películas biodegradables basadas en almidón. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(1), 182–192.
- Escobar, J. (2020). Elaboración y caracterización de biopelículas elaboradas con quitosano y adicionadas con partículas de almidón. *Universidad Autónoma Del Estado De México*, 1–66.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- Food and Agriculture Organization. (2007). *Brassica oleracea var. capitata*. Ecocrop. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/3716/>
- Freitas, P. A. V., Silva, R. R. A., de Oliveira, T. v., Soares, R. R. A., Junior, N. S., Moraes, A. R. F., Pires, A. C. dos S., & Soares, N. F. F. (2020). Development and characterization of intelligent cellulose acetate-based films using red cabbage extract for visual detection of volatile bases. *LWT*, 132. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109780>
- Gao, J., Cheng, B. B., Liu, Y. F., Li, M. M., & Zhao, G. Y. (2022). Effects of red cabbage extract rich in anthocyanins on rumen fermentation, rumen bacterial community, nutrient digestion, and plasma indices in beef bulls. *Animal*, 16(5), 100510. <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2022.100510>
- Ghareaghajlou, N., Hallaj-Nezhadi, S., & Ghasempour, Z. (2021). Red cabbage anthocyanins: Stability, extraction, biological activities and applications in food systems. *Food Chemistry*, 365, 130482. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130482>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1). <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res*, 206, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Grembecka, M. (2019). Sugar Alcohols. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 265–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21625-9>

- Gupta, R. K., Guha, P., & Srivastav, P. P. (2022). Natural polymers in bio-degradable/edible film: A review on environmental concerns, cold plasma technology and nanotechnology application on food packaging- A recent trends. *Food Chemistry Advances*, 1, 100135. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100135>
- Guy, R. C. E. (2016). Extrusion Technologies. En *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00144-x>
- Haddar, W., ben Ticha, M., Meksi, N., & Guesmi, A. (2018). Application of anthocyanins as natural dye extracted from Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra: dyeing studies of wool and silk fibres. *Natural Product Research*, 32(2), 141–148. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1342080/SUPPL_FILE/GNPL_A_1342080_SM0584.PDF
- Jakubowska, E., Gierszewska, M., Szydłowska-Czerniak, A., Nowaczyk, J., & Olewnik-Kruszkowska, E. (2023). Development and characterization of active packaging films based on chitosan, plasticizer, and quercetin for repassed oil storage. *Food Chemistry*, 399, 133934. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133934>
- Kirtil, E., Kilercioglu, M., & Oztop, M. H. (2016). Modified Atmosphere Packaging of Foods. *Reference Module in Food Science*, December. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03218-2>
- Kumari, S. V. G., Pakshirajan, K., & Pugazhenthii, G. (2022). Recent advances and future prospects of cellulose, starch, chitosan, polylactic acid and polyhydroxyalkanoates for sustainable food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 163–182. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.08.203>
- Li, R., Anos, J. H., Tadini, C. C., & Gastaldi, E. (2021). New strategies to fabricate starch/chitosan-based composites by extrusion. *Journal of Food Engineering*, 290, 110224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110224>
- López-García, F., & Jiménez-Martínez, C. (2015). Películas Biopoliméricas: Aplicaciones para Envases y otros Productos. *Omnia Science*, 9–36. <https://doi.org/10.3926/oms>
- Ma, X., Qiao, C., Zhang, J., & Xu, J. (2018). Effect of sorbitol content on microstructure and thermal properties of chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 1294–1297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.060>
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. En *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 52, pp. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>
- Matet, M., Heuzey, M. C., Ajjji, A., & Sarazin, P. (2015). Plasticized chitosan/polyolefin films produced by extrusion. *Carbohydrate Polymers*, 117, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.058>
- Melaj, M. A. (2012). Matrices Poliméricas Sólidas Basadas En Quitosano Y Xantano Para Liberación Controlada De Fertilizantes. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 3(1), 1–9.

- Mendes, J. F., Paschoalin, R. T., Carmona, V. B., Sena Neto, A. R., Marques, A. C. P., Marconcini, J. M., Mattoso, L. H. C., Medeiros, E. S., & Oliveira, J. E. (2016a). Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 452–458. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.10.093>
- Mendes, J. F., Paschoalin, R. T., Carmona, V. B., Sena Neto, A. R., Marques, A. C. P., Marconcini, J. M., Mattoso, L. H. C., Medeiros, E. S., & Oliveira, J. E. (2016b). Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 452–458. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.10.093>
- Mukherjee, P. K. (2019). Phyto-Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Their Evaluation. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*, 707–722. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00020-X>
- Netramai, S., Kijchavengkul, T., Samsudin, H., & Lertsiri, S. (2020). Enhanced Extraction of Anthocyanins from Red Cabbage (*Brassica oleracea*) Using Microwave Assisted Extraction. *The 21st Food Innovation Asia Conference 2019 (FIAC 2019)*, 2019(June).
- Página 173 - FARMACOPEA. (s/f). Recuperado el 9 de noviembre de 2022, a partir de http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page173.html
- Palma-Rodríguez, H., Salgado-Delgado, R., Páramo-Calderón, D., Vargas-Torres, A., & Meza-Nieto, M. (2017). Caracterización parcial de películas biodegradables elaboradas con almidón de plátano y proteínas séricas de la leche. *Acta Universitaria*, *27*(1), 26–33. <https://doi.org/10.15174/au.2017.1215>
- Pavlath, A. E., & William, O. (2013). Películas y recubrimientos comestibles: ¿Por qué, qu+ y cómo? *Dordrecht; Nueva York: Springer, C2009*, 1–23. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-92824-1_1
- Pereira, V. A., de Arruda, I. N. Q., & Stefani, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, *43*, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.014>
- Pichardo Perez, F. F. (2019). *Obtención de pigmentos bioactivos a partir de col morada (Brassica oleracea Var. capitata) y evaluación de su aplicación en un producto alimenticio* [Universidad Autónoma del Estado de México]. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/104607>
- Pietta, P., Minoggio, M., & Bramati, L. (2003). Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, *28*, 257–312. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80143-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80143-6)
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *34*(7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>

- Pravasi, S. D. (2014). Acetic Acid. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 33–35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00216-5>
- Ravanfar, R., Moein, M., Niakousari, M., & Tamaddon, A. (2018). Extraction and fractionation of anthocyanins from red cabbage: ultrasonic-assisted extraction and conventional percolation method. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2271–2277. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9844-y>
- Reyes, B. A. S., Dufourt, E. C., Ross, J., Warner, M. J., Tanquilut, N. C., & Leung, A. B. (2018). Selected Phyto and Marine Bioactive Compounds: Alternatives for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Studies in Natural Products Chemistry*, 55, 111–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64068-0.00004-8>
- Ribeiro Sanches, M. A., Camelo-Silva, C., da Silva Carvalho, C., Rafael de Mello, J., Barroso, N. G., Lopes da Silva Barros, E., Silva, P. P., & Pertuzatti, P. B. (2021). Active packaging with starch, red cabbage extract and sweet whey: Characterization and application in meat. *Lwt*, 135(April 2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110275>
- Sánchez Aldana, D., Contreras-Esquivel, J. C., Nevárez-Moorillón, G. v., & Aguilar, C. N. (2015). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano. *CYTA - Journal of Food*, 13(1), 17–25. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.904929>
- Seitz, H. U., & Hinderer, W. (1988). Anthocyanins. *Phytochemicals in Plant Cell Cultures*, 49–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715005-5.50010-8>
- Serrano, C., Santos, R., Viegas, C., Sapata, M. M., Galhano, R., Condeço, J., Marques, A. C., & Bordado, J. C. (2022). Jo ur na l P re r oo f. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 100480. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100480>
- Shojaee Kang Sofla, M., Mortazavi, S., & Seyfi, J. (2020). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blends plasticized and compatibilized by glycerol/polyethylene glycol. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115784. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115784>
- Silva-Pereira, M. C., Teixeira, J. A., Pereira-Júnior, V. A., & Stefani, R. (2015). Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 258–262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.041>
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.011>
- Soković, M., & Liaras, K. (2021). Natural products as antifungals. *Antifungal Compounds Discovery*, 67–165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815824-1.00004-4>
- Solano-Doblado, L. G., Alamilla-Beltrán, L., & Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 30. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153>

- Sutharsan, J., Boyer, C. A., & Zhao, J. (2022). Physicochemical properties of chitosan edible films incorporated with different classes of flavonoids. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4, 100232. <https://doi.org/10.1016/J.CARPTA.2022.100232>
- Valavanidis, A., & Vlachogianni, T. (2013). Plant Polyphenols: Recent Advances in Epidemiological Research and Other Studies on Cancer Prevention. *Studies in Natural Products Chemistry*, 39, 269–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62615-8.00008-4>
- Wernke, M. J. (2014). Glycerol. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 754–756. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00510-8>
- Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., & Topolska, J. (2013). Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, 51(1), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.015>
- Ye, Q., Wang, H., & Xu, J. (2015). Application of NMR Spectroscopy for the Characterization of Dietary Polyphenols. *Applications of NMR Spectroscopy*, 3, 37–77. <https://doi.org/10.1016/B978-1-68108-063-5.50002-3>
- Yoshida, C. M. P., Maciel, V. B. v., Mendonça, M. E. D., & Franco, T. T. (2014). Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.015>
- Zhang, X., Lu, S., & Chen, X. (2014). A visual pH sensing film using natural dyes from *Bauhinia blakeana* Dunn. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 198, 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.094>

CAPÍTULO 10

ANEXOS

Anexo 1 Cuantificación de antocianinas

Para determinar el contenido de antocianinas por el método de pH diferencial se realizaron las siguientes soluciones:

- a) Buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025M. Se pesaron 0.0279 g de cloruro de potasio (KCl, se disolvieron en 10 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 1 con HCl concentrado, posteriormente se aforó a 15 ml con agua destilada.
- b) Buffer de acetato de sodio (CH₃CO₂Na) 0.4M. Se pesaron 0.4918 g de acetato de sodio (CH₃CO₂Na), se disolvieron en 10 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 4.5 con HCl concentrado, posteriormente se aforó a 15 ml con agua destilada.

Se tomaron dos alícuotas del extracto a analizar y se diluyeron, una con el buffer de pH 1 y la otra con el buffer de pH 4.5, se tomó en cuenta el factor de dilución para que las muestras pudieran ser leídas por el espectrofotómetro, en el cual se realizó un barrido de 400 a 700 nm de cada una de las diluciones.

La cantidad de antocianinas totales de las muestras se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A)(PM)(FD)(1000)}{\varepsilon * 1}$$

Donde:

$$A = (A_{max} - A_{700})_{pH=1.0} - (A_{max} - A_{700})_{pH=4.5}$$

$$PM = \text{peso molecular de antocianina} \left(449.02 \frac{\text{gr}}{\text{mol}} \right)$$

$$FD = \text{factor de dilución}$$

$$\varepsilon = \text{coeficiente de extinción molar} (26,900 \text{ L/cm mol})$$

Anexo 2 Cuantificación de capacidad antioxidante por DPPH*

Para la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH* se utilizaron las siguientes soluciones:

1. Solución stock del radical DPPH* (0.025 g/L). Se pesaron 0.0025 g de DPPH* y se aforó a 100 ml con metanol, protegiéndolo de la luz.
2. Solución stock de TROLOX (2 mM). Se pesaron 0.0050 g de TROLOX y aforar a 10 ml con metanol.

Para la curva patrón se realizaron diluciones a partir de la solución stock de TROLOX (1.2 mM), tomando en cuenta la siguiente tabla:

Tabla 8. Preparación de la curva patrón de DPPH*

Tubo	Concentración de TROLOX		TROLOX (ml)	Metanol (ml)
	mM	mg/ml		
1	1.200	0.3000	1.50	8.50
2	0.800	0.2000	6.66 (tubo 1)	3.34
3	0.400	0.1000	5.00 (tubo 2)	5.00
4	0.300	0.0800	7.50 (tubo 3)	2.50
5	0.240	0.0600	8.00 (tubo 4)	2.00
6	0.150	0.0370	6.25 (tubo 5)	3.75
7	0.006	0.0015	0.40 (tubo 6)	9.60

Se tomaron 1950 μ L ml de la solución del radical DPPH* y se colocaron en un tubo eppendorf junto con 50 μ L de las diluciones de TROLOX o de la muestra a analizar y se agitó con vórtex. Las preparaciones se dejaron reposar a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 30 min, posteriormente se midió la absorbancia a 515 nm, se calibró el espectrofotómetro con metanol. Adicionalmente, se preparó un blanco colocando 2000 μ L de la solución DPPH* y se realizó la lectura por triplicado.

La capacidad antioxidante y el porcentaje de inhibición de la muestra se calcularon con base a las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde:

Ab = absorbancia del blanco a 515 nm

A_m = absorbancia de la muestra a 515 nm

$$TEAC (mM) = \frac{D.O.+b}{m} \times FD$$

Donde:

$D.O.$ = absorbancia de la muestra a 515 nm

b = ordenada al origen

m = pendiente

FD = factor de dilución

El resultado se expresó como capacidad antioxidante equivalente de TROLOX (mM). La curva patrón se muestra en la Fig. 11.

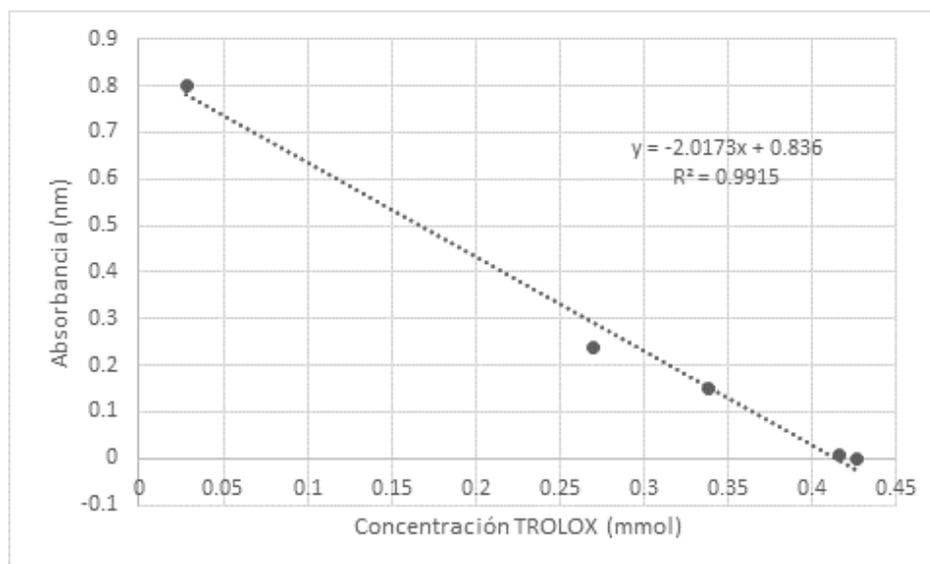


Fig. 11 Preparación de la curva patrón de DPPH•