

## Película biodegradable de quitosano y extracto de granada para inhibir el crecimiento de microorganismos en el empaqueo de la fresa.

Teresa Darlen Carrillo-Castillo<sup>a\*</sup>, Ayerim Hernández-Almanza<sup>a</sup>, E. Armando Zaragoza-Contreras<sup>b</sup>.

<sup>a)</sup> Universidad Autónoma de Coahuila, Carretera Torreón-Matamoros Km 7.5, Ejido el Águila, 27275. Torreón, Coahuila.

<sup>b)</sup> Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C, Avenida Miguel de Cervantes Saavedra 120, Complejo Industrial Chihuahua. C.P. 31136. \*teresadarlen@hotmail.com

**Resumen:** Hoy en día, evitar el desperdicio de alimentos es una prioridad en toda la cadena de producción. Cuando, además, el alimento se empaqueta utilizando materiales que no son biodegradables, el desecho de los alimentos ocasiona contaminación al medio ambiente. La película desarrollada se preparó con una solución de quitosano y polietilenglicol, enriquecida con extracto de cáscara de granada. El extracto contiene compuestos bioactivos de la familia de los polifenoles, lo que le confiere características físicas y químicas especiales a la película de quitosano. Los análisis revelaron que la película tiene propiedades de barrera a la luz, que es permeable al agua, que posee propiedades antifúngicas y que puede descomponerse en el suelo en relativo corto tiempo. Sin embargo, la resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación de la película se reducen en un 50% en comparación con una película de quitosano sin el extracto. Para probar el potencial de esta película en el empaqueo de alimentos, se formaron empaques minoritarios en el que se almacenaron fresas naturales. Las propiedades fisicoquímicas de las fresas se evaluaron durante el almacenamiento a 4 °C durante diez días. Los resultados demostraron que la película ayudó a preservar la calidad y la seguridad de las fresas y extendió su vida útil hasta nueve días después de la maduración completa. En general, esta película tiene un gran potencial como envase activo para alimentos, con el beneficio adicional de reducir el impacto ambiental.

### Introducción.

La industria del envasado de alimentos se enfrenta actualmente a muchos desafíos. Los materiales para el empaqueo de alimentos se utilizan en toda la cadena de producción, desde la cosecha hasta el consumidor final <sup>1</sup>. La necesidad de crear empaques seguros y multifuncionales que eviten el desperdicio de alimentos sigue siendo una prioridad. Pero ahora es preciso fabricarlos con materiales que sean biodegradables en poco tiempo y, de ser posible, que sean de origen renovable y natural, ya que los polímeros sintéticos, debido a su prolongada vida útil, provocan una considerable contaminación al medio ambiente <sup>2</sup>.

El quitosano es un polímero de origen natural, producido a partir de la desacetilación de la quitina, que está siendo ampliamente utilizado para el empaqueo de alimentos, debido a que es no tóxico, biodegradable, tiene capacidad antioxidante, antifúngica, bactericida <sup>3</sup> y no afecta las propiedades de los alimentos después de un tiempo prolongado de almacenamiento <sup>4</sup>. Pero cuando se utiliza para fabricar películas de envasado, las fuerzas

interactivas entre las partes polares y no polares de la estructura del quitosano producen una matriz de película cohesiva, que tiende a encogerse al secarse y volverse quebradiza <sup>5</sup>. Para superar esta desventaja, se agregan plastificantes para mejorar sus propiedades. El poli(etilenglicol)(PEG) es un polímero utilizado como aditivo que mejora la ductilidad de las películas elaboradas con quitosano, al reducir su cristalinidad <sup>6</sup>. Por ello, en este proyecto se evaluó el comportamiento de películas de quitosano plastificadas con PEG<sub>600</sub> (de bajo peso molecular) para lograr películas flexibles.

Por otro lado, cuando se utiliza quitosano para formar películas, sus cadenas tienden a estar dispuestas en una estructura de red, y esta característica se ha aprovechado para incorporar componentes activos, que pueden potenciar sus propiedades antifúngicas y antimicrobianas para ampliar sus aplicaciones como envase activo<sup>3</sup>. Los extractos de plantas son agentes activos que se han utilizado para incorporar en películas debido a que contienen considerables concentraciones de compuestos fenólicos<sup>7</sup>. Estos compuestos

tenidos se han encontrado en altas concentraciones en extractos obtenidos de cáscara de granada, lo que le otorga propiedades antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes<sup>8</sup>. Es importante mencionar que la cáscara de granada suele ser un material de desecho de las fábricas de jugos<sup>9</sup>, por lo que utilizarla para crear empaques activos agrega valor a este residuo agroindustrial.

Es así como esta investigación buscó desarrollar una película a base de la mezcla de extractos de quitosano-PEG-extracto de cáscara de granada, para crear empaques activos que pudieran prolongar la vida útil de los alimentos almacenados en ella. Para evaluar su capacidad protectora, se crearon empaques minoritarios para empaquetar fresas frescas en estado completo de maduración. Este fruto es muy valorado y adquirido por el consumidor, pero tiende a descomponerse en pocos días, por lo cual se desecha con frecuencia, junto con el empaque que lo contiene. La aplicación a este fruto, ayudaría a prolongar su vida útil y cuando finalmente sea desechado, el empaque puede degradarse en condiciones ambientales.

### Parte experimental.

**Materiales.** Quitosano con un grado de desacetilación del 85% (Sigma-Aldrich), poli(etilenglicol) (600 g mol<sup>-1</sup>, Sigma) y ácido acético. Medio de cultivo PDA (Sigma). Extracto de granada obtenido según la descripción en la metodología.

### Obtención de extractos de granada

Los frutos de granada (*Punica granatum*) se adquirieron en un mercado local en Parras de Fuente Coahuila, México. Los frutos se lavaron, la cáscara se separó utilizando un cuchillo de cocina, se cortó en trozos de 10 x 10 mm y se retiraron las membranas. Los trozos se secaron en un horno a 50 °C durante 24 h. Las cáscaras secas se molieron hasta obtener un polvo de 500 µm. Para la extracción, 5 g del polvo se colocaron en un matraz y se agregaron 50 mL de una solución hidroalcohólica de etanol-agua (50-50%) (v/v). Se mantuvo bajo agitación magnética (1200 rpm) a 50 +/- 2 °C durante 2 h<sup>10</sup>. Luego de la extracción, la solución se filtró y el filtrado se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante se mantuvo en estufa a 50 °C hasta obtener el extracto seco. Se realizó un

análisis en HPLC del extracto crudo para evaluar el contenido de compuestos bioactivos (resultados no mostrados).

### Preparación de las películas

En una solución acuosa de ácido acético al 1% (v/v), se dispersó quitosano (QS) para alcanzar una concentración final de 1% (p/v). La mezcla se mantuvo a 50 °C con agitación magnética de 1500 rpm durante 2 horas. Previamente, se disolvieron 0.1 g de PEG en 5 mL de agua destilada durante 24 horas a 30 °C con agitación magnética de 500 rpm. Esta solución de PEG se añadió a la solución de QS, se redujo la temperatura a 30 °C y se continuó con la agitación magnética a 1500 rpm durante 30 minutos. Para las películas con extracto de granada (EX), después de la adición de PEG, se añadió EX en una proporción de 1:10 con respecto al QS. La agitación se mantuvo durante 30 minutos adicionales mientras se protegía la solución de la luz. Las soluciones se identificaron como CS/PEG y CS/PEG/EX para el quitosano sin extracto y el quitosano con extracto, respectivamente.

### Moldeo de las películas

Se cubrió un rectángulo de vidrio con una película de Teflón™ y se sellaron los bordes con plastilina para evitar fugas<sup>11</sup>. Cada solución se vertió en el molde y se dejó secar a 30 +/- 1 °C durante tres días<sup>4</sup>. Las películas se despegaron y se cubrieron con papel hasta su uso.

### Capacidad antifúngica de las películas

La actividad antifúngica se determinó mediante el método de difusión en disco<sup>12,13</sup>. *Botrytis cinerea* se inoculó en agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 28 °C durante 7 días. Las esporas del hongo se resuspendieron en agua destilada estéril y se ajustaron a 10<sup>6</sup> esporas/mL. Un volumen con la suspensión de esporas se extendió en cajas Petri con medio PDA. Círculos de 2 cm de diámetro de las películas se esterilizaron durante 7 min mediante exposición a una fuente de luz UV y enseguida se colocaron en el centro de las cajas sobre el inóculo de esporas. Las cajas y se incubaron a 28 °C durante 5 días. Se preparó una placa del inóculo sin películas como control.

### Degradabilidad en suelo

Una caja de cartón se llenó hasta la mitad de su capacidad con una muestra de suelo. La superficie se dividió en cuadrantes iguales, cada uno asignado a una película diferente, con tres repeticiones. Se cortaron piezas de 3 x 3 cm de las películas, se pesaron y se enterraron a 1 cm de profundidad en su cuadrante asignado. La caja se colocó en condiciones ambientales naturales en la ciudad de Torreón (Coahuila, México), donde la temperatura promedio fue de 30 °C, la humedad relativa fue de 26% y las ráfagas de viento promedio alcanzaron los 20 km/h durante los 3 meses que duró el experimento. Las películas fueron desenterradas, pesadas y examinadas semanalmente para evaluar su apariencia estructural.

### Aplicación en las fresas

Para evaluar la utilidad de la película como empaque de alimentos, se elaboraron bolsas de 10 \* 15 cm, utilizando las formulaciones QS/PEG y QS/PEG/EX (en adelante denominadas T1 y T2, respectivamente). Las fresas se adquirieron en el mercado local (Torreón, ciudad) el mismo día de su recepción. Las fresas se transportaron inmediatamente al laboratorio y se refrigeraron a 4 °C durante 1 h. Las fresas se seleccionaron en estado de plena madurez, sin daño en la piel y sin presencia de microorganismos. Las frutas se lavaron durante 5 s en una solución de cloro a 200 ppm y se dejaron secar al aire. Finalmente, las frutas se envasaron en las bolsas elaboradas con las películas T1 y T2, con tres repeticiones. Las propiedades fisicoquímicas de las fresas se analizaron durante el almacenamiento a 4 °C durante 10 días. Como control, algunas fresas se mantuvieron en empaques comerciales y se almacenaron en las mismas condiciones.

### Instrumentación.

**UV-Vis.** Las propiedades de barrera de luz de las películas se observaron en el rango de luz visible (400–700 nm) utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution™ 220, ThermoScientific™).

### Propiedades Mecánicas

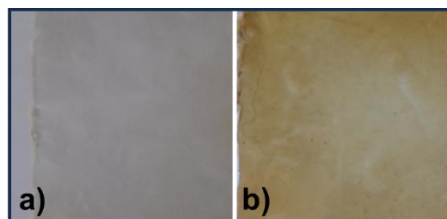
La resistencia a la tracción y el alargamiento de rotura de las películas se midieron

utilizando un analizador dinámico mecánico modelo RSAIII de TA Instruments (New Castle, DE, EE. UU.).

## Resultados y discusión.

### 1. Propiedades de las películas

En la figura 1 se muestra la apariencia de las películas. La adición del extracto, cambió el color de las películas de transparente a un color amarillo opaco.



**Figura 1.** Apariencia visual de las películas. (a) CS/PEG; (b) CS/PEG/EX.

#### 1.1 UV-Vis

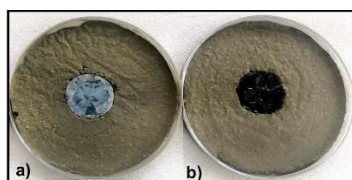
El espectro Uv-Vis realizado a las películas sin extracto presentaron una absorbancia mínima a 300 nm; la adición del extracto aumentó la absorbancia hasta 450 nm, lo que indica que las películas se vuelven opacas. Este comportamiento indica malas propiedades de barrera de luz en la película QS/PEG. Sin embargo, cuando se incorporó el extracto, la absorción de luz aumentó, lo que indica que puede funcionar como una barrera contra el paso de la luz. Esto se atribuye a los compuestos polifenólicos en el extracto que absorben la luz y reducen su paso<sup>14</sup>.

#### 1.2 Propiedades mecánicas.

La prueba mecánica realizada en la película QS/PEG mostró una resistencia a la tracción de 22.5 MPa con un porcentaje de elongación del 12%. En comparación, la película QS/PEG/EX tuvo una resistencia a la tracción de 18 MPa con un alargamiento del 4%. Entonces, la resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación de la película QS/PEG tuvieron valores superiores en un 50% a la película con el extracto. Según informes, la adición de extractos a las películas de quitosano provoca valores de elongación y resistencia más bajos en comparación con las películas sin extractos<sup>4</sup>. Sin embargo, las películas QS/PEG/EX eran flexibles y no se rompieron al manipularlas durante la prueba.

### 1.3 Propiedad antifúngica

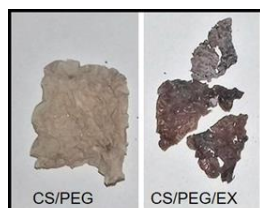
Después de 5 días, el hongo no pudo prosperar para crecer en toda el área ocupada por la película QS/PEG/EX, a diferencia de la película QS/PEG (Fig. 2). Esto sugiere que los compuestos activos del extracto no se liberan, sino que se mantiene en la matriz del film. Este fenómeno ha sido descrito por algunos investigadores<sup>15</sup>. La presencia de polifenoles en el extracto no permite que el hongo utilice los nutrientes del medio para crecer y, por tanto, detiene su proliferación. Debido a la resistencia a la colonización fúngica que presenta QS/PEG/EX, se puede asumir que no habrá crecimiento del hongo si la película mantiene contacto directo con el alimento.



**Figura 2.** Ensayo de inhibición después de 5 días de crecimiento de *Botrytis cinerea*. a) QS/PEG; b) QS/PEG/EX.

### 1.4 Degradabilidad en suelo

La degradabilidad en el suelo se manifestó como la fragmentación de las películas que contenían el extracto, lo que se apreció a partir del día 30 de estar enterrado en el suelo. Aunque las películas QS/PEG se mantuvieron intactas, con una ligera pérdida de peso, las películas QS/PEG/EX, que contenían el extracto de granada, presentaron desde la primera semana un cambio de color, de un amarillo fuerte a un marrón intenso. Después de 30 días, se observó fragmentación, que continuó de manera constante hasta una degradación severa (Fig. 3). Este comportamiento indica que la película con el extracto es fotodegradable, lo que la hace ideal para su uso como empaque en las condiciones climáticas locales.



**Figura 3.** Películas a los 60 días de enterramiento en el suelo

## 2. Aplicación en las fresas.

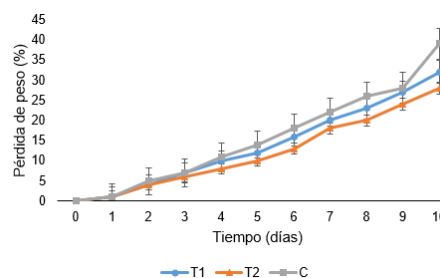
En la figura 4 se muestran los empaques aplicados a las fresas. Las reacciones enzimáticas y no enzimáticas que ocurren en la fresa durante el almacenamiento, resultan en un ablandamiento excesivo de la textura, pérdida de funciones nutricionales y reducción de la vida útil.



**Figura 4.** Fresas depositadas en los empaques. (a) QS/PEG; (b) QS/PEG/EX. Dos tratamientos, tres repeticiones.

### 2.1 Pérdida de peso

Hasta el día 3, la pérdida de peso fue similar para los tratamientos y el control. A partir del día 4, el control comenzó a perder más peso que las fresas con los tratamientos. Durante los 10 días del ensayo, la pérdida para los dos tratamientos fue gradual y sostenida, alcanzando un máximo de 32% para T, 28% para T2 y 39% para el control (Fig. 5).



**Figura 5.** Pérdida de peso de fresas durante 10 días de almacenamiento. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 10 mediciones por tratamiento.

### 2.2 Ensayos fisicoquímicos

En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos en el día 10. El análisis ANOVA de todos los datos mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en T2 para firmeza y acidez titulable, en comparación con T1 y el control. La firmeza es un indicador clave de la calidad de las fresas, mientras que la acidez titulable está relacionada con el sabor y la estabilidad de las propiedades antioxidantes.

Esto sugiere que el tratamiento T2 puede retrasar la pérdida de textura de las fresas y mantener un perfil de sabor más fresco, preservando sus propiedades nutricionales. En consecuencia, ese tipo de empaque podría ser más efectivo en la conservación de la calidad nutricional de las fresas durante el almacenamiento, haciéndolas más atractivas para los consumidores y reduciendo su desperdicio.

**Tabla 1.** Valores de los ensayos FQ en la fresa al día 10

ID	Firmeza (N)	pH	SST (°Brix)	Acidez titulable
T1	2.3	3.73	7.67	0.88
T2	2.6	3.63	6.33	0.92
Ctrl	0.7	3.72	8.67	0.62

T1 = QS/PEG; T2 = QS/PEG/EX; Ctrl = Empaque comercial. Datos representativos del día 10. Análisis estadístico de todos los datos y gráficas no se muestran.

### Conclusiones.

El extracto de granada influyó en el comportamiento fisicoquímico de la película de quitosano. Aunque el extracto redujo la elasticidad, las mantuvo dúctiles y resistentes para elaborar empaques con capacidad de contener alimentos. La propiedad de barrera a la luz y la capacidad antifúngica son atributos deseables para preservar la calidad de los alimentos y prolongar su vida útil. La película CS/PEG/EX mantuvo la humedad de las fresas y redujo significativamente su pérdida de firmeza y la acidez titulable después de 9 días de almacenamiento y evitó la proliferación de microorganismos en comparación con el empaque comercial. Se concluye que las películas enriquecidas con extracto de cáscara de granada, tienen potencial para ser utilizadas como empaque activo de alimentos, debido a sus propiedades y comportamiento ecológico.

### Agradecimientos.

Se agradece al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo a esta investigación a través de la beca otorgada a Teresa Darlen Carrillo-Castillo (No. Becaria 447478).

### Referencias.

1. Anis, A. & Pal, K. Essential Oil-Containing Polysaccharide-Based Edible Films and Coatings for Food

2. Security Applications. (2021). Pirsas, S., Karimi Sani, I., Pirouzifard, M. K. & Erfani, A. Smart film based on chitosan/Melissa officinalis essences/pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage. *Food Addit. Contam. Part A* **37**, 634–648 (2020).
3. Priyadarshi, R. & Rhim, J. W. Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **62**, 102346 (2020).
4. Mehdizadeh, T., Tajik, H., Langroodi, A. M., Molaei, R. & Mahmoudian, A. Chitosan-starch film containing pomegranate peel extract and Thymus kotschyianus essential oil can prolong the shelf life of beef. *Meat Sci.* **163**, 108073 (2020).
5. Santana, A. A. & Kieckbusch, T. G. Physical evaluation of biodegradable films of calcium alginate plasticized with polyols. *Brazilian J. Chem. Eng.* **30**, 835–845 (2013).
6. He, L. H., Xue, R., Yang, D., Liu, Y. & Song, R. Effects of blending chitosan with peg on surface morphology, crystallization and thermal properties. *Chinese J. Polym. Sci.* **27**, 501 (2009).
7. Yuan, G., Lv, H., Yang, B., Chen, X. & Sun, H. Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract. *Molecules* **20**, 11034–11045 (2015).
8. Potrč, S., Glaser, T. K., Vesel, A., Ulrih, N. P. & Zemljič, L. F. Two-layer functional coatings of chitosan particles with embedded catechin and pomegranate extracts for potential active packaging. *Polymers (Basel)*. **12**, (2020).
9. Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A. & Singh, N. Antimicrobial potential of pomegranate peel: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **54**, 959–965 (2019).
10. Rongai, D. *et al.* Effect of pomegranate peel extract on shelf life of strawberries: computational chemistry approaches to assess antifungal mechanisms involved. *J. Food Sci. Technol.* **55**, 2702–2711

- (2018).
11. Roy, S. & Rhim, J. W. Preparation of pectin/agar-based functional films integrated with zinc sulfide nano petals for active packaging applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **207**, 111999 (2021).
  12. Srisa, A. & Harnkarnsujarit, N. Antifungal films from trans-cinnamaldehyde incorporated poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) for bread packaging. *Food Chem.* **333**, 127537 (2020).
  13. Klinmalai, P., Srisa, A., Laurenza, Y., Katekhong, W. & Harnkarnsujarit, N. Antifungal and plasticization effects of carvacrol in biodegradable poly(lactic acid) and poly(butylene adipate terephthalate) blend films for bakery packaging. *Lwt* **152**, 112356 (2021).
  14. Zhang, X. *et al.* Development of multifunctional food packaging films based on chitosan, TiO<sub>2</sub> nanoparticles and anthocyanin-rich black plum peel extract. *Food Hydrocoll.* **94**, 80–92 (2019).
  15. Ordon, M., Nawrotek, P., Stachurska, X. & Mizielińska, M. Polyethylene Films Coated with Antibacterial and Antiviral Layers Based on CO<sub>2</sub> Extracts of Raspberry Seeds, of Pomegranate Seeds and of Rosemary. *Coatings* **11**, 1179 (2021).