

Physicochemical and antifungal properties of active gelatin-carboxymethylcellulose films with coconut shell extract

Propiedades fisicoquímicas y antifúngicas de películas activas de gelatina-carboximetilcelulosa con extracto de cáscara de coco

Maria Fernanda Vargas-Torrco¹; Erich von Borries-Medrano^{1*}; Salvador Valle-Guadarrama²; Miguel Ángel Aguilar-Méndez¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada – Unidad Legaria, Calzada Legaria, núm. 694, colonia Irrigación, Ciudad de México, C. P. 11500, MÉXICO.

²Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

*Corresponding author: evonborries@ipn.mx, tel. 55 42 98 21 02.

Abstract

Introduction: The formulation of bioactive packaging represents an innovative alternative to control the development of microorganisms affecting the shelf life of foods.

Objective: The aim of this study was to analyze the effect of a coconut shell extract added to gelatin-carboxymethylcellulose biopolymeric films on their physicochemical and antifungal properties to determine their potential use as packaging material for fruit and vegetable products.

Methodology: Gelatin-carboxymethylcellulose films were prepared with different concentrations of coconut shell extract and their thickness, mechanical (puncture force and tensile strength), physical (water vapor permeability) and microstructural properties, color, FTIR, UV light transmittance, opacity and *in vitro* antifungal activity were determined.

Results: Changes in mechanical, physical and microstructural properties were observed depending on the concentration of the extract. The color was modified by the effect of the extract, with higher opacity and lower light transmittance as its concentration increased. Intermolecular interactions between the biopolymers and the extract components were observed in the FTIR spectra. *In vitro* tests showed inhibitory capacity on the growth of *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer*.

Limitations of the study: The effect of the coconut shell additive only applies to the extraction conditions used.

Originality: There are no studies supporting the antifungal capacity of coconut shell extract added to biopolymer films.

Conclusions: Active gelatin-carboxymethylcellulose films with antifungal activity were reported. The physical and structural properties of the films make them suitable for use as packaging material for fruit and vegetable products.

Keywords: biopolymeric matrix, phytopathogens, antimicrobial extract, barrier properties, mechanical properties.

Resumen

Introducción: La formulación de envases bioactivos representa una alternativa innovadora para controlar el desarrollo de microorganismos que afectan la vida de anaquel de los alimentos.

Objetivo: Evaluar el efecto de un extracto de cáscara de coco incorporado a películas biopoliméricas de gelatina-carboximetilcelulosa sobre sus propiedades fisicoquímicas y antifúngicas, para determinar su uso potencial como material de envase de productos hortofrutícolas.

Metodología: Se prepararon películas de gelatina-carboximetilcelulosa con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de coco y se determinó su espesor, propiedades mecánicas (fuerza de punción y resistencia a la tensión), físicas (permeabilidad al vapor de agua) y microestructurales, color, FTIR, transmitancia de luz UV, opacidad y actividad antifúngica *in vitro*.

Resultados: Se observaron cambios en las propiedades mecánicas, físicas y microestructurales dependiendo de la concentración del extracto. El color se modificó por efecto del extracto, observándose mayor opacidad y menor transmitancia de luz conforme aumentó su concentración. En los espectros FTIR se observaron interacciones intermoleculares entre los biopolímeros y los componentes del extracto. Las pruebas *in vitro* demostraron capacidad inhibitoria en el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*.

Limitaciones del estudio: El efecto del aditivo de cáscara de coco solo aplica para las condiciones de extracción utilizadas.

Originalidad: No existen estudios que sustenten la capacidad antifúngica del extracto de cáscara de coco incorporado en películas biopoliméricas.

Conclusiones: Se obtuvieron películas activas de gelatina-carboximetilcelulosa con actividad antifúngica. Las propiedades físicas y estructurales de las películas las hacen aptas para ser empleadas como material de envase para productos hortofrutícolas.

Palabras clave: matriz biopolimérica, fitopatógenos, extracto antimicrobiano, propiedades de barrera, propiedades mecánicas.



Introduction

The COVID-19 pandemic caused an increase in environmental disturbance due to the excessive use of plastic materials, both in food and for personal safety (Benson et al., 2021). The increasing demand for packaged food has increased the consumption of single-use packaging (Janairo, 2021). Therefore, several studies have focused on the development of biodegradable, biocompostable and environmentally friendly packaging (Zhang & Sablani, 2021).

Biopolymer films represent an environmentally friendly packaging alternative. These films are formed by biopolymer matrices with different functionalities, such as moisture barrier properties, active substance carriers and biocompatibility to contain different food. Among the advantages of films made with biopolymers is their rapid biodegradability in the environment (Trajkovska-Petkoska et al., 2021).

Gelatin is one of the most versatile biopolymers in film formation. This polypeptide could be combined easily with lipids and carbohydrates to form a polymeric network due to its gelling properties (Tyuftin & Kerry, 2021). It has also been observed that gelatin films allow the incorporation of different types of additives, with the purpose of extending the shelf life of food products by reducing microbial growth (Roy & Rhim, 2020).

Essential oils, antioxidants and extracts from organic residues, have been added in biopolymeric matrices to delay spoilage caused by microorganisms, with additional benefits in the hygienic-sanitary process of food (Mir et al., 2018). Natural extracts from residues of horticultural products are sources of bioactive compounds, and have been studied as additives in film formation, such is the case of extracts of mango peel (Chaiwarit et al., 2020), orange (Terzioğlu et al., 2021), lime (Rodsamran & Sothornvit, 2019), pineapple (Kumar et al., 2021b), among others.

Coconut shell is a natural resource commonly used as an input for the elaboration of heavy metal removing filters (Sengupta & Basu, 2016); it also represents a high source of fiber and active compounds. However, its effect as an additive in biopolymeric matrices has not been studied. In this regard, the objective of the present study was to evaluate the effect of a coconut shell extract (CSE) added to gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) biopolymeric films on its physicochemical and antifungal properties, to determine its potential use as a packaging material for fruit and vegetable products.

Introducción

La pandemia de COVID-19 provocó un incremento en la perturbación ambiental debido al uso excesivo de materiales plásticos, tanto en los alimentos como para protección personal (Benson et al., 2021). La creciente demanda de alimentos envasados ha aumentado el consumo de envases de un solo uso (Janairo, 2021). Por ello, diversas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de envases biodegradables, biocompostables y amigables con el ambiente (Zhang & Sablani, 2021).

Las películas biopoliméricas representan una alternativa de envase ecológico. Estas películas están formadas por matrices de biopolímeros con diferentes funcionalidades, como propiedades de barrera frente a la humedad, acarreadoras de sustancias activas y biocompatibilidad para contener diversos alimentos. Entre las ventajas que presentan las películas elaboradas con biopolímeros se encuentra la rápida biodegradabilidad en el ambiente (Trajkovska-Petkoska et al., 2021).

La gelatina es uno de los biopolímeros más versátiles en la formación de películas. Este polipéptido, a través de sus propiedades de gelificación, se combina fácilmente con lípidos y carbohidratos para formar una red polimérica (Tyuftin & Kerry, 2021). Asimismo, se ha demostrado que las películas de gelatina permiten incorporar diferentes tipos de aditivos, esto con la finalidad de extender la vida de anaquel de productos alimenticios a través de la reducción del crecimiento microbiano (Roy & Rhim, 2020).

Los aceites esenciales, antioxidantes y extractos de residuos orgánicos, se han incorporado en matrices biopoliméricas para retrasar el deterioro causado por microorganismos, con beneficios adicionales en el proceso higiénico-sanitario de los alimentos (Mir et al., 2018). Los extractos naturales obtenidos de residuos de productos hortofrutícolas son fuentes de compuestos bioactivos, y se han estudiado como aditivos en la formación de películas, tal es el caso de los extractos de cáscara de mango (Chaiwarit et al., 2020), naranja (Terzioğlu et al., 2021), lima (Rodsamran & Sothornvit, 2019), piña (Kumar et al., 2021b), entre otros.

La cáscara de coco es un recurso natural que se utiliza comúnmente como insumo para la elaboración de filtros eliminadores de metales pesados (Sengupta & Basu, 2016); además, representa una alta fuente de fibra y de compuestos activos. No obstante, no se ha estudiado su efecto como aditivo en matrices biopoliméricas. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un extracto de cáscara de

Materials and methods

Materials and reagents

The reagents used to prepare the films were gelatin type B, carboxymethylcellulose (CMC) and glycerol (Merck, Germany), in addition to potato dextrose agar (PDA) and potassium nitrate (Meyer, Mexico). All materials used were analytical reagent grade.

Collection and preparation of coconut shell extract

Coconut (*Cocos nucifera* L.) fruits were purchased at consumption maturity from a local market in Texcoco, Estado de México. Harvest was performed 24 h before purchase. The fruits were transported in plastic containers to the Laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada - Unidad Legaria, del Instituto Politécnico Nacional, where those with mechanical damage or infection by phytopathogens were removed.

To obtain the coconut shell extract, approximately 15 fruits were selected, defibrated and the endocarp was removed. Defibrated samples were ground using a disc mill (148-2, The Bauer Co., USA) and dried in a digital oven (Fe-294AD, Feligneo, Mexico) at 60 ± 2 °C for 24 h. The extraction was performed considering the method described by Nagarajan et al. (2015), with some modifications. A total of 15 g of the dried material was mixed in 500 mL of 30 % (m/v) ethanol. The mixture was sonicated in an ultrasonic bath (TI-H-5, Elma, Germany), centrifuged (model K, International Equipment Co., USA) at 1750 rpm for 30 min and filtered with Whatman No. 1 paper (Whatman® International, Ltd., England). Finally, the filtered mixture was concentrated at 40 ± 2 °C using a rotary evaporator (RE-500, Yamato, Japan) and freeze-dried (FreeZone 4.5, Labconco™, USA), thus obtaining the aqueous-ethanolic coconut shell extract (CSE). The CSE was stored in hermetically sealed amber jars at 53 % relative humidity (RH).

Preparation of active films

Gelatin (G), CMC, and glycerol were dissolved in distilled water using a ratio of 1:1:0.6, respectively. The solution was heated at 90 °C in a stirring hot plate (SP1311325Q, Thermolyne™, USA) with constant stirring (600 rpm) for 1 h. The solution was cooled at room temperature (25 °C), and then different concentrations of CSE were added: G-CMC (control, without addition of extract), 200/CSE (200 mg·L⁻¹ extract), 300/CSE (300 mg·L⁻¹ extract) and 400/CSE (400 mg·L⁻¹ extract). Finally, 25 mL of the solution were poured into Petri dishes (1.5 x 12 cm) and placed in a digital oven at 60 °C for 24 h. The dried films were removed from the dishes and stored in

coco (ECC) incorporado a películas biopoliméricas de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) sobre sus propiedades fisicoquímicas y antifúngicas, para determinar su uso potencial como material de envase de productos hortofrutícolas.

Materiales y métodos

Materiales y reactivos

Los reactivos utilizados para elaborar las películas fueron gelatina tipo B, carboximetilcelulosa (CMC) y glicerol (Merck, Alemania), además de agar papa dextrosa (PDA) y nitrato de potasio (Meyer, México). Todos los materiales fueron grado reactivo analítico.

Recolección y preparación de extracto de cáscara de coco

Se adquirieron frutos de coco (*Cocos nucifera* L.) en estado de madurez de consumo de un mercado local en Texcoco, Estado de México. La cosecha se realizó 24 h antes de la compra. Los frutos se trasladaron en contenedores de plástico al Laboratorio de Biomateriales del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada - Unidad Legaria, del Instituto Politécnico Nacional, donde se descartaron aquellos que presentaron daños mecánicos o infección por fitopatógenos.

Para obtener el extracto de la cáscara de coco, se seleccionaron aproximadamente 15 frutos, los cuales se desfibraron y se les retiró el endocarpio. Las muestras desfibradas se trituraron en un molino de discos (148-2, The Bauer Co., EUA) y se secaron en una estufa digital (Fe-294AD, Feligneo, México) a 60 ± 2 °C durante 24 h. La extracción se realizó considerando el método descrito por Nagarajan et al. (2015), con algunas modificaciones. Se mezclaron 15 g del material seco en 500 mL de etanol al 30 % (m/v). La mezcla se sonicó en un baño ultrasónico (TI-H-5, Elma, Alemania), se centrifugó (modelo K, International Equipment Co., EUA) a 1750 rpm durante 30 min y se filtró con papel Whatman No. 1 (Whatman® International, Ltd., Inglaterra). Finalmente, la mezcla filtrada se concentró a 40 ± 2 °C en un rotavapor (RE-500, Yamato, Japón) y se liofilizó (FreeZone 4.5, Labconco™, EUA), obteniéndose así el extracto acuoso-etanólico de cáscara de coco (ECC). El ECC se almacenó en frascos ámbar herméticamente cerrados a 53 % de humedad relativa (HR).

Preparación de las películas activas

La gelatina (G), la CMC y el glicerol se disolvieron en agua destilada empleando una relación de 1:1:0.6, respectivamente. La solución se calentó a 90 °C en

hermetically sealed bags without exposure to light until analysis. Prior to each characterization, the films were conditioned in a desiccator at 25 °C and 53 % RH.

Characterization of the films

Thickness and mechanical properties

The thickness of the films was measured with a digital micrometer (H-2781, Mitutoyo, Japan), with an accuracy of 0.01 mm. Measurements were taken at ten different positions on each film, and the average was recorded in μm .

The mechanical properties measured were puncture force (N), and tensile strength (MPa) (American Society for Testing and Materials [ASTM], 1995a), both with a texture analyzer (TA-XT2i, Stable Micro Systems, England) and 25 N fixed load cell. To determine the puncture force, 2.5 cm diameter circular samples were cut from each film. The samples were fixed in circular cells adapted for the test. For tensile strength, rectangular specimens of 2 x 4 cm² were cut and placed in the equipment with grip cells. The measurement was performed at a speed of 1 mm·s⁻¹. Finally, this parameter was calculated using Equation 1.

$$\text{Tensile strength} = \frac{F_{max}}{A} \quad (1)$$

Where F_{max} is the maximum force supported by the film (N) and A is the cross-sectional area of the film (m²).

Water vapor permeability (WVP)

Water vapor permeability (WVP; g·m⁻¹·s⁻¹·Pa⁻¹) was determined according to the modified ASTM (1995b) standard method. Containers of 3 cm diameter with a capacity of 120 mL were adapted. Films covered the top of each container and were hermetically sealed with paraffin wax; subsequently, 25 mL of a saturated potassium nitrate solution (40 %) were injected into each container and stored in a controlled chamber at 28 °C and 97 % RH. The containers were weighed every 8 h on a digital balance (Ve-300, Velab™, Mexico) with 0.01 mg resolution. The transpiration rate was determined by linear regression analysis (slope of weight loss by time), and permeability was calculated using Equation 2.

$$WVP = \frac{r_v}{P_v \cdot (RH_1 - RH_2)} \times T \quad (2)$$

Where r_v is the transpiration rate (g·m⁻²·s⁻¹), P_v is the saturation vapor pressure (Pa), RH_1 is the relative humidity of the chamber (dimensionless), RH_2 is the relative humidity of the container (dimensionless) and T is the film thickness (m).

una parrilla eléctrica (SP1311325Q, Thermolyne™, EUA) con agitación constante (600 rpm) durante 1 h. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C), y posteriormente se agregaron diferentes concentraciones de ECC: G-CMC (testigo, sin adición de extracto), 200/ECC (200 mg·L⁻¹ de extracto), 300/ECC (300 mg·L⁻¹ de extracto) y 400/ECC (400 mg·L⁻¹ de extracto). Finalmente, se vertieron 25 mL de la solución en cajas Petri (1.5 x 12 cm) y se colocaron en una estufa digital a 60 °C durante 24 h. Las películas secas se retiraron de las placas y se almacenaron en bolsas herméticamente cerradas y sin exposición a la luz hasta su análisis. Antes de cada caracterización, las películas se acondicionaron en un desecador a 25 °C y 53 % HR.

Caracterización de las películas

Espesor y propiedades mecánicas

El espesor de las películas se midió con un micrómetro digital (H-2781, Mitutoyo, Japón), con una precisión de 0.01 mm. Las mediciones se tomaron en diez posiciones diferentes de cada película y se registró el promedio en μm .

Las propiedades mecánicas medidas fueron la fuerza a la punción (N) y la resistencia a la tensión (MPa) (American Society for Testing and Materials [ASTM], 1995a), ambas con un analizador de textura (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra) y celda de carga fija de 25 N. Para determinar la fuerza de punción se cortaron muestras circulares de 2.5 cm de diámetro de cada película. Las muestras se fijaron en celdas circulares adaptadas para el ensayo. Para la resistencia a la tensión, se cortaron muestras rectangulares de 2 x 4 cm² y se colocaron en el equipo con celdas de agarre. La medición se realizó a una velocidad de 1 mm·s⁻¹. Finalmente, este parámetro se calculó mediante la Ecuación 1.

$$\text{Resistencia a la tensión} = \frac{F_{max}}{A} \quad (1)$$

Donde F_{max} es la fuerza máxima que soporta la película (N) y A es el área transversal de la película (m²).

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua (PVA; g·m⁻¹·s⁻¹·Pa⁻¹) se determinó de acuerdo con el método estándar modificado de ASTM (1995b). Se adaptaron frascos de 3 cm de diámetro con capacidad de 120 mL. Las películas cubrieron la parte superior de cada frasco y se cerraron herméticamente con parafina; posteriormente, se inyectaron 25 mL de una solución saturada de nitrato de potasio (40 %) en cada frasco y se almacenaron en una cámara controlada a 28 °C y 97 % HR. Los frascos se pesaron cada 8 h en una balanza (Ve-300, Velab™,

Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology of the films was observed in a scanning electron microscope (SEM) (JSM 6390 LV, JEOL, Japan) with an accelerating voltage of 10 kV. For this purpose, 4 mm² samples were cut from each film and fixed in cylindrical sample holders with double-sided adhesive carbon tape. The samples were coated with gold by sputtering (Desk IV, Denton Vacuum, USA) for 120 s. The images collected were of the cross-section of the films at magnifications of 1000x and 1500x.

Color

The color of the films was analyzed as described by Nallan-Chakravartula et al. (2020). A CIE Lab high-definition colorimeter (NH300, 3NH, China) was used, and the whiteness index (WI) and yellowness index (YI) were calculated from L^* (luminosity), a^* (greenness/redness) and b^* (blueness/yellowish) values with Equations 3 and 4, respectively:

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (3)$$

$$YI = \frac{142.86 \times b^*}{L^*} \quad (4)$$

A white standard ($L^* = 94.512$, $a^* = 0.417$ and $b^* = 0.350$) was used to calibrate the equipment.

UV light transmittance and opacity

To measure UV light transmittance, 1 x 3 cm² pieces were cut from each film and conditioned in a measuring cell with a spectrophotometer (Lambda 35 UV-Vis, Perkin Elmer®, USA) (Kchaou et al., 2020). The measurement range was set from 200 to 800 nm. Film opacity (abs·mm⁻¹) was determined by Equation 5.

$$Opacity = \frac{Abs_{600}}{x} \quad (5)$$

Where Abs_{600} is the absorbance at 600 nm and x is the thickness of the films (mm).

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The spectra of the films were recorded on an FTIR spectrophotometer (Cary 630, Agilent Technologies, USA), with a resolution of 2 cm⁻¹ and a scan rate of 32 scans·min⁻¹. Measurements were carried out from 4000 to 650 cm⁻¹.

Determination of the in vitro antifungal activity of coconut shell extract

The antifungal activity of CSE was evaluated using concentrations of 0, 200, 300, and 400 mg·L⁻¹. Each concentration was applied on a sterile disc of filter paper (Whatman No. 1) of 25 mm diameter, fixed in the

México) con resolución de 0.01 mg. Para determinar la velocidad de transpiración, se realizó un análisis de regresión lineal (pendiente de pérdida de peso por tiempo), y con la Ecuación 2 se determinó la permeabilidad.

$$PVA = \frac{r_v}{P_{v^*} (HR_1 - HR_2)} \times E \quad (2)$$

Donde r_v es la velocidad de transpiración (g·m⁻²·s⁻¹), P_{v^*} es la presión de vapor de saturación (Pa), HR_1 es la humedad relativa de la cámara (adimensional), HR_2 es la humedad relativa del contenedor (adimensional) y E es el espesor de la película (m).

Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La morfología de las películas se observó en un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JSM 6390 LV, JEOL, Japón), con un voltaje acelerador de 10 kV. Para ello, se cortaron muestras 4 mm² de cada película y se fijaron en porta muestras cilíndricos con cinta de carbono adhesiva de doble cara. Las muestras se recubrieron con oro mediante pulverización catódica (Desk IV, Denton Vacuum, EUA) durante 120 s. Las imágenes obtenidas fueron de la sección transversal de las películas a magnificaciones de 1000x y 1500x.

Color

El color de las películas se analizó de acuerdo con lo descrito por Nallan-Chakravartula et al. (2020). Se utilizó un colorímetro de alta definición CIE Lab (NH300, 3NH, China), y el índice de blancura (IB) e índice de amarillez (IA) se calcularon a partir de los valores L^* (luminosidad), a^* (verde/rojo) y b^* (azul/amarillo) con las Ecuaciones 3 y 4, respectivamente:

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (3)$$

$$IA = \frac{142.86 \times b^*}{L^*} \quad (4)$$

Para calibrar el equipo se utilizó un estándar blanco ($L^* = 94.512$, $a^* = 0.417$ y $b^* = 0.350$).

Transmitancia de luz UV y opacidad

Para medir la transmitancia de luz UV, se cortaron trozos de 1 x 3 cm² de cada película y se acondicionaron en una celda de medición con un espectrofotómetro (Lambda 35 UV-Vis, Perkin Elmer®, EUA) (Kchaou et al., 2020). El rango de medición se estableció de 200 a 800 nm. Por su parte, la opacidad (abs·mm⁻¹) se determinó mediante la Ecuación 5.

$$Opacidad = \frac{Abs_{600}}{x} \quad (5)$$

Donde Abs_{600} es la absorbancia a 600 nm y x es el espesor de las películas (mm).

central part of a Petri dish with PDA. The dishes were pre-inoculated with a suspension of 10^6 spores·mL⁻¹ of *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer* in 20 mL of culture medium, and stored in a digital incubator (IC 403CW, Yamato, Japan) at 25 °C and 97 % RH for 48 h. After the incubation period, the inhibition halo around the disc (mm) was determined using a vernier (500-196-30, Mitutoyo, Japan). The fungal cultures used were collected at the Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma Chapingo using the method of Luksiene and Buchovec (2019).

Statistical analysis

One-way ANOVA analyses were carried out to evaluate the physicochemical and antifungal properties of the films and Tukey's mean comparison tests ($P \leq 0.05$). MINITAB® statistical software was used for the analyses. All analyses were performed in triplicate, and data are reported as the mean \pm standard deviation.

Results and discussion

Thickness and mechanical properties

Film thickness changed significantly ($P \leq 0.05$) among treatments (Table 1). The films with 200/CSE, 300/CSE, and 400/CSE increased 3.4, 11.9 and 14.3 μm compared to the control, respectively. These results suggest compatibility between the gelatin peptides and the extract components, which resulted in the development and formation of a thicker compact matrix. A similar effect was reported by Ahmad et al. (2012) on gelatin films with bergamot and lemongrass extracts. Initially, these authors observed a disruption in the polypeptide chains of gelatin by the presence of the extract; then, these polypeptides were able to interact and form bonds with the phenolic compounds due to the hydrophilic nature of the extract, resulting in a structure with greater size. It should be noted that the thickness of the films tends to increase by incorporating external agents related to the biopolymeric solution since otherwise, the agent could saturate the solution and, consequently, develop thin, fragile, brittle structures with non-soluble residues (Xue et al., 2021). Furthermore, it is essential to obtain a product with greater thickness as packaging material and subsequent handling.

The puncture force of the G-CMC film was 24.5 N, with significant differences ($P < 0.05$) compared to the other treatments (Table 1). The highest force obtained was 34.5 N with 200/CSE. The stability of the matrix may be due to the electrostatic interactions and to the hydrogen bonds established between the hydroxyl groups of the polyphenols of the extract and the hydrophilic acceptor molecules of the gelatin in the biopolymeric matrix (Hoque et al., 2011). Therefore, the increase in

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de las películas se obtuvieron en un espectrofotómetro FTIR (Cary 630, Agilent Technologies, EUA), con una resolución de 2 cm⁻¹ y una velocidad de exploración de 32 escaneos·min⁻¹. Las mediciones se realizaron de 4000 a 650 cm⁻¹.

Determinación de la actividad antifúngica in vitro del extracto de cáscara de coco

La actividad antifúngica del ECC se evaluó empleando concentraciones de 0, 200, 300 y 400 mg·L⁻¹. Cada concentración se aplicó en un disco estéril de papel filtro (Whatman No. 1) de 25 mm de diámetro, el cual se fijó en la parte central de una caja de Petri con PDA. Las cajas se inocularon previamente con una suspensión de 10^6 esporas·mL⁻¹ de *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer* en 20 mL de medio de cultivo, y se almacenaron en una incubadora digital (IC 403CW, Yamato, Japón) a 25 °C y 97 % HR por 48 h. Después del periodo de incubación, se determinó el halo de inhibición alrededor del disco (mm) utilizando un vernier (500-196-30, Mitutoyo, Japón). Los cultivos de hongos utilizados se obtuvieron en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma Chapingo con el método de Luksiene y Buchovec (2019).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza de una sola vía para evaluar las propiedades fisicoquímicas y antifúngicas de las películas, y pruebas de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Para los análisis se utilizó el programa estadístico MINITAB®. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar.

Resultados y discusión

Espesor y propiedades mecánicas

El espesor de las películas varió significativamente ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 1). Las películas con 200/ECC, 300/ECC y 400/ECC incrementaron 3.4, 11.9 y 14.3 μm con respecto al testigo, respectivamente. Estos resultados sugieren compatibilidad entre los péptidos de la gelatina y los componentes del extracto, lo cual dio lugar al desarrollo y formación de una matriz compacta de mayor espesor. Un efecto similar fue reportado por Ahmad et al. (2012) en películas de gelatina con extractos de bergamota y limoncillo. Inicialmente, dichos autores observaron una interrupción en las cadenas polipeptídicas de la gelatina por la presencia del extracto, después estos polipéptidos fueron capaces de interactuar y formar enlaces con los compuestos fenólicos de naturaleza

Table 1. Thickness, puncture force, tensile strength, water vapor permeability (WVP) and opacity of gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) films and those added with different concentrations of coconut shell extract (CSE). Cuadro 1. Espesor, resistencia a la punción, resistencia a la tensión, permeabilidad al vapor de agua (PVA) y opacidad de las películas de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) y las adicionadas con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de coco (ECC).

Treatment/ Tratamiento	Thickness/ Espesor (μm)	Puncture force/ Fuerza de punción (N)	Tensile strength/ Resistencia a la tensión (MPa)	WVP/PVA ($\times 10^{-11}$, $\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$)	Opacity/Opacidad ($\text{abs}\cdot\text{mm}^{-1}$)
Control/Testigo (G-CMC)	23.4 \pm 0.3 a	24.5 \pm 1.3 a	14.8 \pm 1.4 a	3.3 \pm 0.2 a	2.76 \pm 0.1 a
200 mg·L ⁻¹ (200/CSE / 200/ECC)	26.8 \pm 1.1 b	34.5 \pm 0.9 b	16.7 \pm 1.2 ab	3.7 \pm 0.1 a	4.91 \pm 0.1 b
300 mg·L ⁻¹ (300/CSE / 300/ECC)	35.3 \pm 0.6 c	30.1 \pm 0.7 c	20.1 \pm 1.9 b	5.3 \pm 0.1 b	5.16 \pm 0.1 c
400 mg·L ⁻¹ (400/CSE / 400/ECC)	37.7 \pm 0.8 d	29.4 \pm 0.7 c	16.3 \pm 1.0 a	6.1 \pm 0.1 c	5.30 \pm 0.2 c

Means with the same letter in each column are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$).

Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

the strength of the films with CSE could be related to the formation of a stable biopolymeric network according to the extract concentration. On the other hand, puncture force decreased significantly ($P < 0.05$) in the 300/CSE and 400/CSE treatments compared to 200/CSE. As mentioned above, at high concentrations of external agents, the solution saturates the available bonds and generates a dense structure. Similar results were obtained by Kan et al. (2019) on chitosan/gelatin films with *Crataegus pinnatifida* extract.

Similar to the previous analysis, the tensile strength decreased significantly when incorporating 400 mg·L⁻¹ of CSE, compared to the treatment with 300 mg·L⁻¹. This decrease could be due to the high concentration of phenolic compounds, which generated a heterogeneous structure with discontinuous areas in the film. These results agree with those reported by Kchaou et al. (2020). Furthermore, they indicate that mechanical properties decrease with the incorporation of natural extracts in quantities greater than the saturation of the solution or when generating incompatibility with the biopolymers of the matrix because it creates a decrease in the density of intermolecular interactions and an increase in the free volume between the gelatin chains, which causes fragility in the films.

The highest puncture force and tensile strength were achieved when the extract was applied at low and medium concentrations (200 and 300 mg·L⁻¹). This phenomenon occurs because of the stability of the biopolymeric network generated through electrostatic interactions and hydrogen bonds between the extract and the biopolymeric matrix. On the other hand, the maximum extract concentration (400 mg·L⁻¹) decreases the mechanical properties, since the compounds in the extract reduce the density of

hidrofílica del extracto, dando lugar a una estructura con mayor magnitud. Cabe señalar que el espesor de las películas tiende a incrementar al incorporar agentes externos afines a la solución biopolimérica, ya que de lo contrario el agente podría saturar la solución y, por consiguiente, desarrollar estructuras delgadas, frágiles, quebradizas y con restos no solubles (Xue et al., 2021). Asimismo, es determinante la obtención de un producto con mayor espesor como material de envase y posterior manipulación.

La fuerza de punción de la película de G-CMC fue de 24.5 N, con diferencia significativa ($P < 0.05$) comparada con los demás tratamientos (Cuadro 1). La mayor fuerza obtenida fue de 34.5 N con 200/ECC. La estabilidad de la matriz se pudo deber a las interacciones electroestáticas, y a los puentes de hidrógeno establecidos entre los grupos hidroxilo de los polifenoles del extracto y las moléculas hidrofílicasceptoras de la gelatina en la matriz biopolimérica (Hoque et al., 2011). En consecuencia, el incremento en la fuerza de las películas con ECC podría estar relacionado con la formación de una red biopolimérica estable en función de la concentración del extracto. Por otro lado, la fuerza de punción disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en los tratamientos 300/ECC y 400/ECC, en comparación con 200/ECC. Como se mencionó anteriormente, en concentraciones elevadas de agentes externos, la solución satura los enlaces disponibles y genera una estructura densa. Kan et al. (2019) obtuvieron resultados similares en películas de gelatina/quitosano con extracto de *Crataegus pinnatifida*.

De manera similar al análisis anterior, la resistencia a la tensión disminuyó significativamente al incorporar 400 mg·L⁻¹ de ECC, con respecto al tratamiento con 300 mg·L⁻¹. Dicha disminución se pudo deber a la

intermolecular interactions, which generates a discontinuous polymeric network. Therefore, the incorporation of CSE into the biopolymeric matrix modified both the mechanical properties and the thickness of the active films without compromising their formation, handling, and demolding. Higher values of resistance and puncture strength are desirable in developing biopolymeric films aimed at food packaging because they reflect the net load they can support during handling.

WVP

The lowest WVP value was reported in the control films ($3.3 \times 10^{-11} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$), while films with CSE increased their value by 0.4, 2, and $2.8 \times 10^{-11} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$, with 200/CSE, 300/CSE, and 400/CSE, respectively (Table 1). The incorporation of CSE significantly ($P < 0.05$) affected the WVP values. The increasing values were proportional to the concentration of extract added to the film-forming solution. The high permeability can be explained by the sorption, diffusion, and desorption processes, where polymers of a hydrophilic nature transit and may increase that parameter (Xu et al., 2020). First, the phenomenon consists of sorption and solubilization of biopolymers, followed by diffusion of water molecules in the matrix and desorption or evaporation (drying phase) of water molecules on the film surface.

In the present study, the concentration of biopolymers, plasticizer, and water were the same; therefore, the increase in permeability was caused by the concentration of the added extract. Dou et al. (2018) found that WVP in gelatin films was affected by the incorporation of plant extracts, as a dense network structure was formed between the polymers and the extract, thereby decreasing the permeability. In another study, Malherbi et al. (2019) found that WVP in gelatin films with guabiroba pulp extract had variable results regarding the concentration of the added extract.

The results of the present study confirm that WVP in gelatin films is related to the proportion of the extract added to the solution. Thus, as the amount of extract increases, the heterogeneous areas generated by G-CMC-CSE interactions increase, which triggers the discontinuity in the polymeric network and increases WVP. The measurement of this parameter is decisive in films for food preservation, due to the need for protection and a barrier against the concentration of water vapor from the environment and the food.

SEM

In the micrographs of the control film, a smooth, uniform structure with no visible cracks is observed (Figure 1a), reflecting good compatibility and

elevada concentración de compuestos fenólicos, lo cual generó una estructura heterogénea con áreas discontinuas en la película. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kchaou et al. (2020). Asimismo, ellos señalan que las propiedades mecánicas disminuyen con la incorporación de extractos naturales en cantidades mayores a la saturación de la solución o al generar incompatibilidad con los biopolímeros de la matriz, ya que crea una disminución en la densidad de las interacciones intermoleculares y un aumento en el volumen libre entre las cadenas de gelatina, lo cual provoca fragilidad en las películas.

La mayor resistencia a la punción y a la tensión se alcanzaron cuando el extracto se aplicó en concentraciones bajas y medias (200 y 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Este fenómeno ocurre por la estabilidad de la red biopolimérica generada a través de interacciones electroestáticas y puentes de hidrógeno entre el extracto y la matriz biopolimérica. Por otro lado, la máxima concentración de extracto (400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) disminuyó las propiedades mecánicas, ya que los compuestos presentes en el extracto reducen la densidad de las interacciones intermoleculares, lo cual genera una red polimérica discontinua. Por lo tanto, la incorporación de ECC en la matriz biopolimérica modificó tanto las propiedades mecánicas como el espesor de las películas activas, sin comprometer su formación, manejo y desmolde. Valores mayores de resistencia y fuerza de punción son deseables en el desarrollo de películas biopoliméricas dirigidas al envasado de alimentos, debido a que reflejan la carga neta que pueden soportar durante su manejo.

PVA

El valor más bajo de PVA se obtuvo en las películas testigo ($3.3 \times 10^{-11} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$), mientras que las películas con ECC incrementaron su valor en 0.4, 2 y $2.8 \times 10^{-11} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$, con 200/ECC, 300/ECC y 400/ECC, respectivamente (Cuadro 1). En general, la incorporación de ECC afectó significativamente ($P < 0.05$) los valores de PVA, ya que se registraron valores crecientes proporcionales a la concentración de extracto añadida a la solución filmógena. La alta permeabilidad se puede explicar mediante los procesos de sorción, difusión y desorción por los que transitan los polímeros de naturaleza hidrofílica y que están involucrados en el incremento de este parámetro (Xu et al., 2020). En primer lugar, el fenómeno consiste en la sorción y solubilización de los biopolímeros, seguido de la difusión de las moléculas de agua en la matriz y la desorción o evaporación (fase de secado) de las moléculas de agua en la superficie de la película.

En el presente estudio, la concentración de los biopolímeros, el plastificante y el agua fueron los mismos; por tanto, el incremento en la permeabilidad

homogeneity between polymers in the matrix. This homogeneity is attributed to the affinity among gelatin, CMC, and glycerol in aqueous medium. Water favors the formation of molecular interactions such as hydrogen bonds among these biopolymers (Nazmi et al., 2017).

The homogeneous structure of the film was affected when 200 mg·L⁻¹ of CSE were added (Figure 1b). Roughness is evidence of dispersion of the extract in the matrix, where hydrophobic interactions of CSE and the formation of hydrophilic interactions with the phenolic compounds in the extract are involved (Nor Adilah et al., 2020).

An intensification of roughness and craters can be seen in the cross-section images of the 300/CSE and 400/CSE films (Figures 1c and 1d), with irregular and discontinuous sections. This heterogeneous surface is consistent with increasing extract concentration. Similar results were reported by Rasid et al. (2018) on gelatin films with extract of *Centella asiatica* L. Thus, the roughness and cracks observed in films intensified as the extract increased. Furthermore, these changes are

fue ocasionado por la concentración del extracto añadido. Dou et al. (2018) encontraron que la PVA en películas de gelatina se vio afectada por la incorporación de extractos vegetales, ya que entre los polímeros y el extracto se formó una estructura de red densa, y con ello disminuyó la permeabilidad. En otro estudio, Malherbi et al. (2019) encontraron que la PVA en películas de gelatina con extracto de pulpa de guabiroba tuvo resultados variables con respecto a la concentración del extracto añadido.

Los resultados del presente estudio confirman que la PVA en películas de gelatina está relacionada con la proporción del extracto añadido a la solución. Así, a medida que se incrementa la cantidad de extracto, aumentan las áreas heterogéneas generadas por las interacciones G-CMC-ECC, las cuales desencadenan la discontinuidad en la red polimérica y generan el incremento en la PVA. La medición de dicho parámetro es determinante en películas dirigidas a la conservación de alimentos, debido a la necesidad de protección y a una barrera frente a la concentración de vapor de agua del ambiente y del alimento.

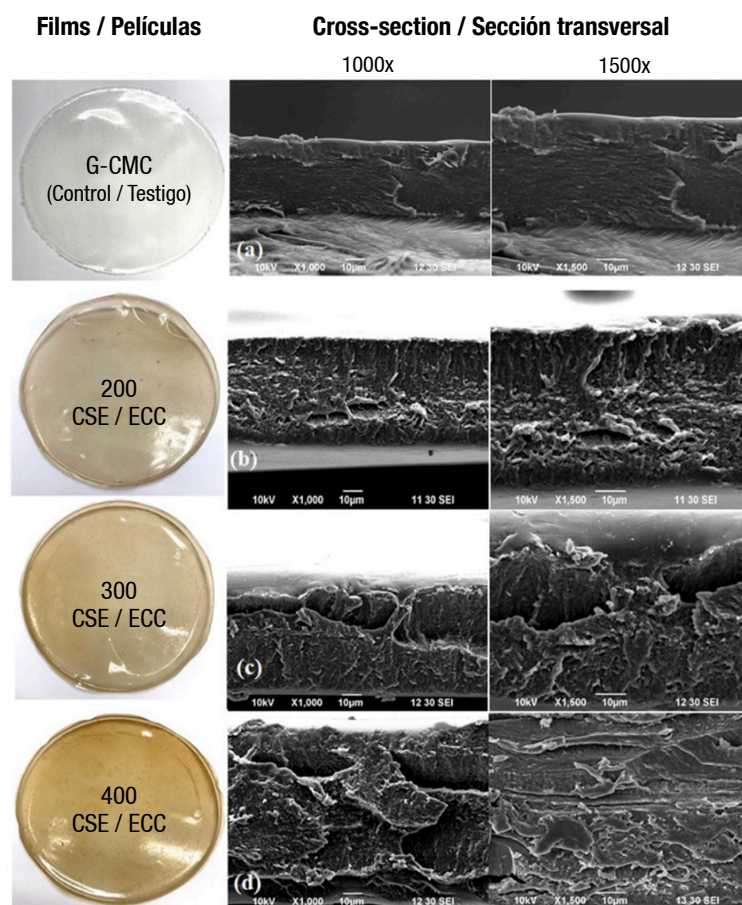


Figure 1. Scanning electron microscopy images of the cross-section of gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) films and those with different concentrations of coconut shell extract (CSE) at 1000x and 1500x magnification.

Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la sección transversal de las películas de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) y las adicionadas con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de coco (ECC) en magnificación de 1000x y 1500x.

correlated with the formation of intermolecular bonds between polymers (FTIR section). Finally, although the addition of extract increased the complexity in the matrix, the discontinuities in the biopolymeric network caused by CSE addition did not compromise the formation of films.

Color

The highest values of luminosity (L^*) and parameter a^* (greenness/redness) were obtained with the control treatment (Figure 2). In contrast, films with CSE showed a significant ($P < 0.05$) decrease in L^* values and, consequently, an increase in a^* and b^* (blueness/yellowish) values. This indicates that films lost luminosity and acquired a yellowish tone, which agrees with the YI results, because as the amount of CSE in the G-CMC matrix increased, the level of brownness in the film increased.

The results were consistent with the WI , where a significant effect was also observed according to the CSE concentration. The lowest value of that parameter was observed in the treatment with the highest CSE concentration (Figure 2). This indicated that the color of the control films, being colorless and translucent, can change its hue with a minimum of additive concentration. In this case, the observed changes in color parameters were mainly attributed to the presence of phenolic compounds of CSE, which presented a brown coloration upon incorporation (Li et al., 2021). Therefore, the addition of CSE into the G-CMC matrix significantly modified the color parameters of the films. The development of new materials with color contribution can reduce light exposure, and thus avoid oxidative damage to food products, suggesting an improved packaging technology.

Light transmittance and opacity

The incorporation of CSE in the gelatin and carboxymethylcellulose matrix caused significant changes ($P < 0.05$) in the transmittance values according to the added extract concentration (Figure 3). The transmittance in films with CSE increased from 350 nm, while in the control film it was from 200 nm; i.e., a translucent film was obtained in the entire light spectrum studied. Although the G-CMC film was translucent and glossy, the incorporation of the extract changed the transparency of the film to a brownish-yellow color.

The color contributed by the CSE could be due to the high content of lignin, which is characterized by absorbing UV light, as demonstrated in several studies (Shikinaka et al., 2020). In food packaging, materials that create a barrier to UV-Vis light are desirable to

MEB

En las micrografías de la película testigo, se observa una estructura lisa, uniforme y sin grietas visibles (Figura 1a), lo cual refleja una buena compatibilidad y homogeneidad entre los polímeros de la matriz. Esta homogeneidad se atribuye a la afinidad entre la gelatina, la CMC y el glicerol en el medio acuoso. El agua favorece la formación de interacciones moleculares como puentes de hidrógeno entre estos biopolímeros (Nazmi et al., 2017).

La estructura homogénea de la película se afectó cuando se adicionaron 200 mg·L⁻¹ de ECC (Figura 1b). Las rugosidades son evidencia de una dispersión del extracto en la matriz, donde intervienen interacciones hidrofóbicas del ECC y la formación de interacciones hidrofílicas con los compuestos fenólicos del extracto (Nor Adilah et al., 2020).

En la sección transversal de las películas 300/ECC y 400/ECC (Figuras 1c y 1d), se aprecia una intensificación de rugosidades y cráteres, con secciones irregulares y discontinuas. La superficie heterogénea es consistente con el incremento de la concentración de extracto. Resultados similares fueron reportados por Rasid et al. (2018) en películas de gelatina con extracto de *Centella asiatica* L. Por tanto, conforme aumentó la cantidad del extracto, se intensificaron las rugosidades y grietas observadas en las películas. Además, estos cambios se correlacionan con la formación de enlaces intermoleculares entre polímeros (sección de FTIR). Finalmente, a pesar de que la adición de extracto incrementó la complejidad en la matriz, las discontinuidades en la red biopolimérica causadas por la adición de ECC no comprometieron la formación de las películas.

Color

Los mayores valores de luminosity (L^*) y del parámetro a^* (rojo/verde) se obtuvieron con el tratamiento testigo (Figura 2). En contraste, las películas con ECC mostraron una disminución significativa ($P < 0.05$) en los valores de L^* y, por consiguiente, un incremento en los valores de a^* y b^* (amarillo/azul). Esto indica que las películas perdieron luminosity y adquirieron un tono amarillento, lo cual concuerda con los resultados del IA , ya que a medida que aumentó la cantidad de ECC en la matriz de G-CMC, incrementó el nivel de pardez en la película.

Los resultados obtenidos fueron consistentes con el IB , donde también se observó un efecto significativo en función de la concentración del ECC. El valor más bajo de dicho parámetro se observó en el tratamiento con la mayor concentración de ECC (Figura 2). Esto indicó que el color de las películas testigo, al ser

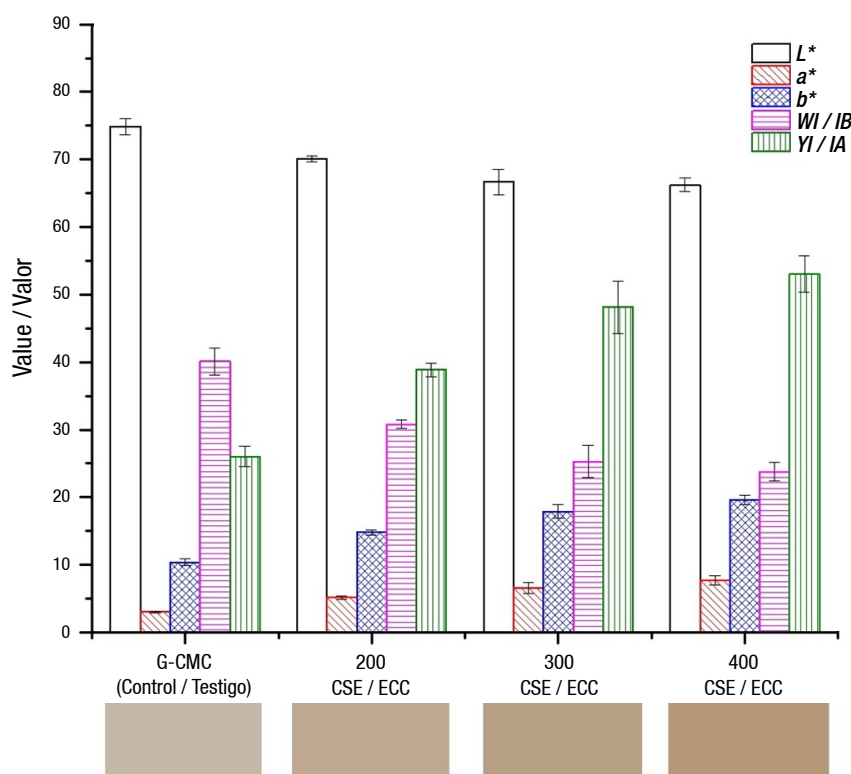


Figure 2. Luminosity (L^*), color parameters a^* and b^* , whiteness index (WI) and yellowness index (YI) of gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) films and those added with different concentrations of coconut shell extract (CSE).

Figura 2. Luminosidad (L^*), parámetros de color a^* y b^* , índice de blancura (IB) e índice de amarillez (IA) de las películas de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) y las adicionadas con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de coco (ECC).

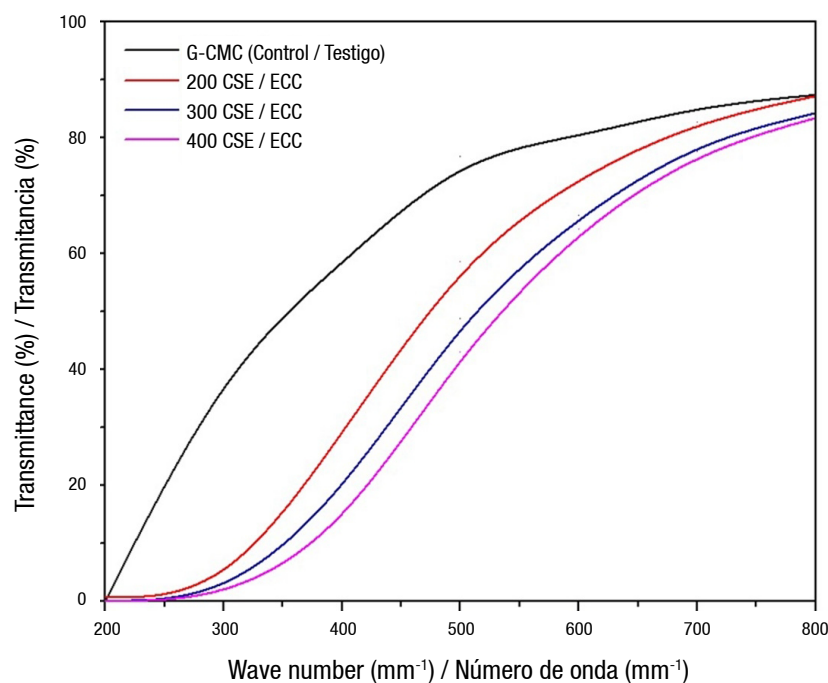


Figure 3. UV-Vis light transmittance of gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) films and those with different concentrations of coconut shell extract (CSE).

Figura 3. Transmitancia de luz UV-Vis de las películas de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) y las adicionadas con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de coco (ECC).

reduce lipid peroxidation, nutrient loss and thereby prevent the generation of unpleasant odors and flavors (Ge et al., 2018). Therefore, the films with CSE obtained in the present study have an advantage as UV light blockers.

The results obtained by UV-Vis indicate higher opacity as the concentration of the CSE increases (Table 1). Both transparency and opacity of films are important optical properties in materials intended for food packaging. High absorbance indicates higher transparency and thus lower opacity (Khedri et al., 2021). Since this is a light color contributed by CSE, the films maintained relatively low opacity (Figure 4). A similar result was reported by Nor Adilah et al. (2020) on gelatin films with mango peel extract, where the yellowish tone observed was attributed to the carotenoids present in the fruit due to its ripening state.

Having a film with higher opacity for the packaging material industry might seem a disadvantage, since a translucent material is desirable; however, in foods with high fatty acid content, such as avocado, cheese, meat, among others, it is essential to handle the food with a material that avoids oxidation against UV light (Michelin et al., 2020). In this sense, CSE could be a natural additive alternative to decrease UV light transmittance and increase opacity in G-CMC films and, with this, create a packaging material with barrier properties at wavelengths from 200 to 350 nm.

FTIR

In the FTIR spectra of the G-CMC film and its interactions with CSE at different concentrations, characteristic bands of gelatin such as amide A at 3270 cm^{-1} , amide B at 2930 cm^{-1} , amide I at 1634 cm^{-1} , amide II at 1534 cm^{-1} and amide III at 1240 cm^{-1} were detected

incoloras y translúcidas, pueden cambiar su tonalidad con un mínimo de concentración de aditivo. En este caso, los cambios observados en los parámetros de color se atribuyeron, principalmente, a la presencia de compuestos fenólicos del ECC, el cual presentó una coloración marrón al momento de su incorporación (Li et al., 2021). Por tanto, la incorporación del ECC en la matriz de G-CMC modificó significativamente los parámetros de color de las películas. El desarrollo de nuevos materiales con aporte de color puede reducir la exposición a la luz, y así evitar daños oxidativos a los productos alimenticios, lo cual sugiere una tecnología de envasado mejorada.

Transmitancia de luz y opacidad

La incorporación del ECC en la matriz de gelatina y carboximetilcelulosa provocó cambios significativos ($P < 0.05$) en los valores de transmitancia en función de la concentración de extracto agregada (Figura 3). La transmitancia en películas con ECC incrementó a partir de 350 nm, mientras que en la película testigo fue desde 200 nm; es decir, se obtuvo una película traslúcida en todo el espectro de luz estudiado. Aunque la película de G-CMC fue translúcida y brillante, la incorporación del extracto cambió la transparencia de la película a un color amarillo pardo.

El color aportado por el ECC se podría deber al alto contenido de lignina, la cual se caracteriza por absorber la luz UV, como se ha demostrado en diversas investigaciones (Shikinaka et al., 2020). En el envasado de alimentos, son deseables los materiales que crean una barrera a la luz UV-Vis para reducir la peroxidación de lípidos, la pérdida de nutrientes y, con ello, evitar la generación de olores y sabores desagradables (Ge et al., 2018). Por tanto, las películas con ECC obtenidas en el presente estudio poseen una ventaja como bloqueadoras de luz UV.

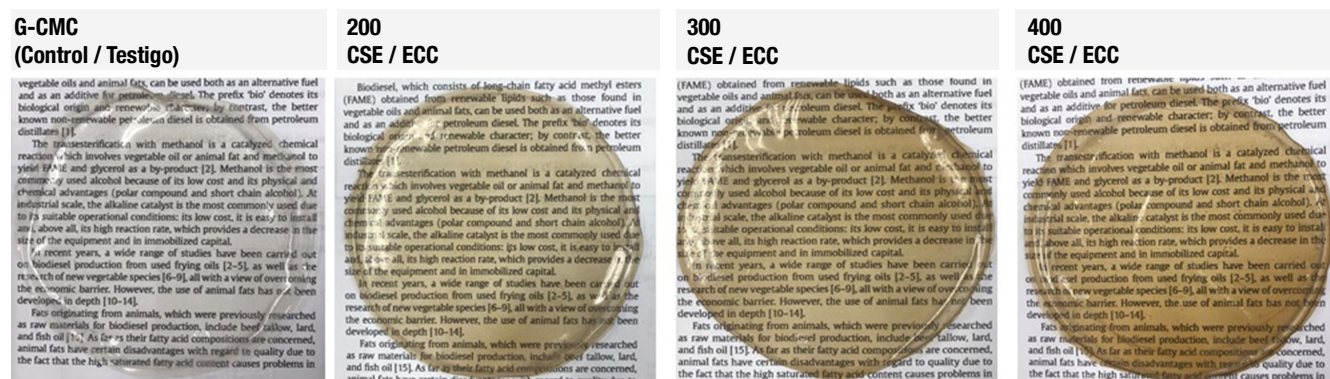


Figure 4. Opacity of gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) films and those with different concentrations of coconut shell (CSE).

Figura 4. Opacidad de las películas de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) y las adicionadas con diferentes concentraciones de cáscara de coco (ECC).

(Figure 5), which represent the vibrational modes of the peptide bond of gelatin. These findings are consistent with that reported by Rasid et al. (2018). Additionally, all films showed similar bands in the range of 3200 to 3500 cm^{-1} , attributed to amide A interactions (N-H stretching vibrations) and intermolecular and intramolecular interactions of the -OH groups of the polymeric components (gelatin, carboxymethylcellulose and glycerol). In the films with CSE, an increase in the stretching of the -OH band is shown, which could be due to the number of compounds of phenolic nature in the extract (Tanwar et al., 2021).

The peaks at 2930 cm^{-1} and 2880 cm^{-1} are characteristic of amide B (C-N stretching and C=O asymmetric stretching vibrations). The C-H interaction in the 2930 cm^{-1} band represents the methane ring of the CMC hydrogen atoms, which is consistent with that reported by Kowalczyk et al. (2020). The band 1634 cm^{-1} is attributed to amide I, which represents the C=O bonds of gelatin, and the COOH-coupled hydrogen bond of CMC. The band present at 1534 cm^{-1} refers to amide II of gelatin (N-H and C=O interactions). Similarly, amide II could be interacting with the -COOH

Los resultados obtenidos mediante UV-Vis indican una mayor opacidad a medida que aumenta la concentración del ECC (Cuadro 1). Tanto la transparencia como la opacidad de las películas son propiedades ópticas importantes en materiales dirigidos al envasado de alimentos. Una alta absorbancia indica mayor transparencia y, por tanto, menor opacidad (Khedri et al., 2021). Dado que se trata de un color ligero aportado por el ECC, las películas mantuvieron una opacidad relativamente baja (Figura 4). Un resultado similar fue reportado por Nor Adilah et al. (2020) en películas de gelatina con extracto de cáscara de mango, donde el tinte amarillento observado fue atribuido a los carotenoides contenidos en el fruto debido a su estado de madurez.

Obtener una película con mayor opacidad para la industria de material de envasado podría parecer una desventaja, ya que es deseable un material translúcido; sin embargo, en alimentos con alto contenido de ácidos grasos, como el aguacate, el queso, la carne, entre otros, es indispensable la manipulación del alimento con un material que evite la oxidación frente a los rayos UV (Michelin et al., 2020). En este sentido, el ECC podría ser una alternativa de aditivo natural para disminuir

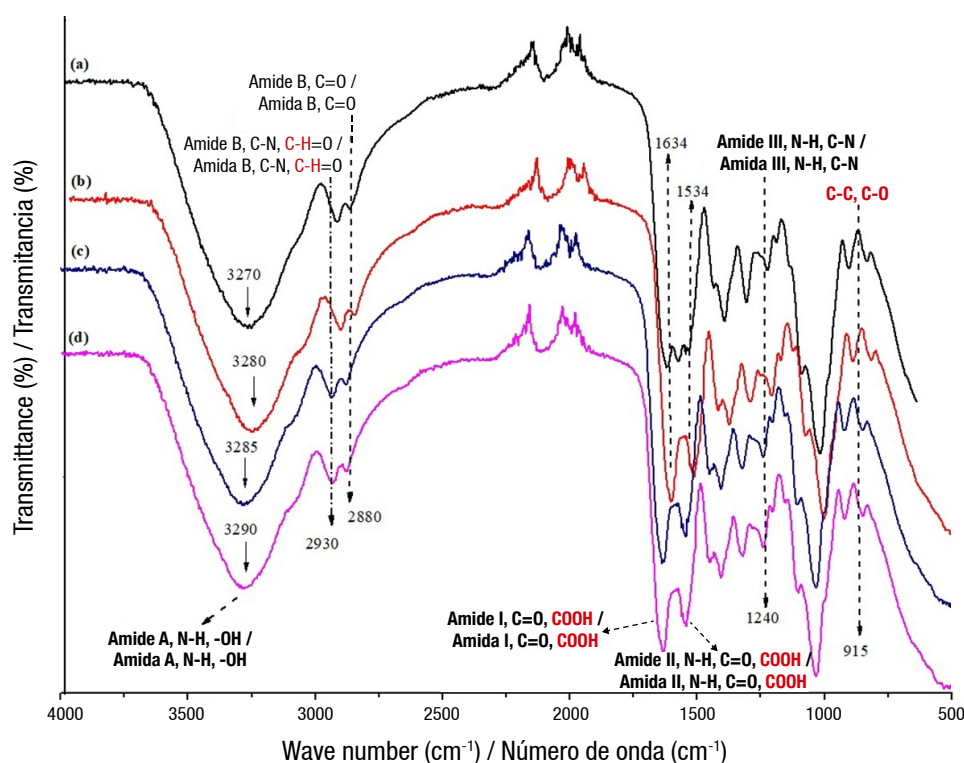


Figure 5. Fourier transform infrared spectroscopy spectra of gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) films and those with different concentrations of coconut shell extract (CSE): a) G-CMC (control, without adding CSE), b) 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of CSE (200/CSE), c) 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of CSE (300/CSE) and d) 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of CSE (400/CSE).

Figura 5. Espectros de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de las películas de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) y las adicionadas con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de coco (ECC): a) G-CMC (testigo, sin adición de ECC), b) 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ECC (200/ECC), c) 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ECC (300/ECC) y d) 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ECC (400/ECC).

group of CMC (Esteghlal et al., 2018). At 1240 cm^{-1} amide III is identified with N-H and C-N bonds, and in the band present at 915 cm^{-1} , C-C and C-O interactions of CMC are observed (Kowalczyk et al., 2020).

The study of the FTIR spectra was carried out to evaluate and determine the interactions between the compounds involved in the polymeric solution. The incorporation of CSE in the G-CMC films favored intermolecular and intramolecular interactions by non-covalent bonds between the -OH groups of the compounds.

In vitro antifungal activity

The G-CMC film showed no inhibition of the growth of *R. stolonifer* and *A. niger* strains (Table 2), indicating that this film has no antifungal properties against the strains studied. These results are consistent with that reported by Sahraee et al. (2017) on gelatin films. The above shows that biopolymers lack of inhibitory activity.

The treatments 200/CSE and 300/CSE showed antifungal activity by presenting an inhibition halo of 64.17 and 64.10 mm for *R. stolonifer*, and 64.10 and 64.87 mm for *A. niger*, respectively. Furthermore, increasing the concentration of CSE to 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ resulted in higher inhibitory activity against both fungal strains (Table 2). The antifungal activity of coconut shell is related to the presence of a high content of catechins. In addition, many studies have reported a high content of lignin and condensed tannins in coconut shell, to which antibacterial (*Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*), antiviral and anticancer properties have been attributed (Prakash et al., 2018).

la transmitancia de luz UV e incrementar la opacidad en películas de G-CMC y, con ello, crear un material de envasado con propiedades de barrera en longitudes de onda de 200 a 350 nm.

FTIR

En los espectros FTIR de la película de G-CMC y sus interacciones con el ECC en diferentes concentraciones, se detectaron bandas características de la gelatina como la amida A en 3270 cm^{-1} , amida B en 2930 cm^{-1} , amida I en 1634 cm^{-1} , amida II en 1534 cm^{-1} y amida III en 1240 cm^{-1} (Figura 5), las cuales representan los modos vibratorios del enlace peptídico de la gelatina. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Rasid et al. (2018). Adicionalmente, todas las películas mostraron bandas similares en el rango de 3200 a 3500 cm^{-1} , atribuidas a las interacciones de la amida A (vibraciones de estiramiento N-H) y a las interacciones intermoleculares e intramoleculares de los grupos -OH de los componentes poliméricos (gelatina, carboximetilcelulosa y glicerol). En las películas con ECC se muestra un incremento en el estiramiento de la banda -OH, lo cual se pudo deber a la cantidad de compuestos de naturaleza fenólica del extracto (Tanwar et al., 2021).

Los picos de 2930 cm^{-1} y 2880 cm^{-1} son característicos de la amida B (vibraciones de estiramiento C-N y vibraciones de estiramiento asimétrico C=O). La interacción C-H en la banda 2930 cm^{-1} representa el anillo de metano de los átomos de hidrógeno del CMC, lo cual es consistente con lo reportado por (Kowalczyk et al., 2020). La banda 1634 cm^{-1} se atribuye a la amida I, que representa a los enlaces C=O de la gelatina, y al enlace de hidrógeno acoplado al COOH del CMC. La banda presente en 1534 cm^{-1} hace referencia a la

Table 2. Antifungal activity of gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) film and those with different concentrations of coconut shell extract (CSE).

Cuadro 2. Actividad antifúngica de la película de gelatina-carboximetilcelulosa (G-CMC) y las adicionadas con diferentes concentraciones de extracto de cáscara de coco (ECC).

Treatments / Tratamientos	Inhibition halo (mm)** / Halo de inhibición (mm)**	
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Control/Testigo (G-CMC)	0.0 ± 0.0 a*	0.0 ± 0.0 a*
200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (200/CSE / 200/ECC)	64.17 (± 0.2) b	64.10 (± 0.3) b
300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (300/CSE / 300/ECC)	64.10 (± 0.1) b	64.87 (± 0.1) c
400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (400/CSE / 400/ECC)	65.0 (± 0.0) c	65.0 (± 0.0) d

* No zone of inhibition, even the fungal pathogen grew on top of the disc. ** Inhibition halo diameter, except for the 25 mm disc diameter. Means with the same letter in each column are not statistically different (Tukey, $P \leq 0.05$).

*No hubo zona de inhibición, incluso el patógeno fúngico creció encima del disco. **Diámetro del halo de inhibición, excluyendo el diámetro del disco de 25 mm. Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

The plausible mechanism of the biocidal activity of CSE, reported as a lignin-rich source, is centered on the cell membrane, as it causes damage and rupture of bacterial cells and, consequently, death of the microorganism (Yang et al., 2016). Moreover, the antimicrobial effect depends on the type of extraction, climatic condition, harvesting period, among other factors (Kumar et al., 2021a). Other studies have confirmed the antimicrobial effect of lignin extracted from various biological sources (de Sousa-Nascimento et al., 2021). Therefore, the incorporation of CSE into G-CMC films represents a packaging alternative with fungicidal action to preserve the shelf life of foods by controlling deterioration caused by the proliferation of phytopathogens.

Conclusions

This study revealed that adding CSE significantly increased the thickness of the films; in addition, it modified the mechanical and vapor permeability properties of the G-CMC films. CSE gave a brown color to the translucent films, increasing the opacity and having a protective effect against UV light. The microstructure was modified by adding CSE; however, the extract had no effect on the formation and release of the films. Furthermore, CSE showed high inhibitory capacity against *R. stolonifer* and *A. niger* strains. Therefore, the films represent a promising material as a substitute for conventional packaging, since, in addition to their characteristics, they can reduce food deterioration caused by fungi.

Acknowledgments

The authors thank the Instituto Politécnico Nacional (SIP Project: 20181062 and 20210011) for funding this research. In addition, the first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del IPN (COFAA) for the scholarships awarded.

End of English version

References / Referencias

- American Society for Testing and Materials (ASTM). (1995a). *Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheet*. ASTM International
- American Society for Testing and Materials (ASTM). (1995b). *Standard test methods for water vapor transmission of materials*. ASTM International
- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., & Agustini, T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of

amida II de la gelatina (interacciones de N-H y C=O). De igual forma, la amida II podría estar interactuando con el grupo -COOH del CMC (Esteghlal et al., 2018). En 1240 cm^{-1} se encuentra identificada la amida III con enlaces N-H y C-N, y en la banda 915 cm^{-1} se observan las interacciones de C-C y C-O del CMC (Kowalczyk et al., 2020).

El estudio de los espectros FTIR se realizó con la finalidad de evaluar y determinar las interacciones entre los compuestos involucrados en la solución polimérica. La incorporación de ECC en las películas de G-CMC favoreció las interacciones intermoleculares e intramoleculares a través de enlaces no covalentes entre los grupos -OH de los compuestos.

Actividad antifúngica *in vitro*

La película de G-CMC no inhibió el crecimiento de las cepas *R. stolonifer* y *A. niger* (Cuadro 2), lo cual indica que esta película no posee propiedades antifúngicas ante las cepas estudiadas. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Sahraee et al. (2017) en películas de gelatina. Lo anterior demuestra que los biopolímeros no poseen actividad inhibitoria.

Los tratamientos 200/ECC y 300/ECC mostraron actividad antifúngica al presentar un halo de inhibición de 64.17 y 64.10 mm para *R. stolonifer*, y de 64.10 y 64.87 mm para *A. niger*, respectivamente. Asimismo, al aumentar la concentración de ECC a $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se obtuvo una mayor actividad inhibitoria contra ambas cepas fúngicas (Cuadro 2). La actividad antifúngica de la cáscara de coco está relacionada con la presencia de un alto contenido de catequinas. Además, varios estudios han reportado un alto contenido de lignina y taninos condensados en la cáscara de coco, a los cuales se les atribuyen acciones antibacterianas (*Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), antivirales y anticancerígenas (Prakash et al., 2018).

El mecanismo plausible de la actividad biocida del ECC, reportado como fuente rica de lignina, se centra en la membrana celular, ya que provoca daños y ruptura en las células bacterianas y, en consecuencia, la muerte del microorganismo (Yang et al., 2016). Adicionalmente, el efecto antimicrobiano es dependiente del tipo de extracción, condición climática, periodo de cosecha, entre otros factores (Kumar et al., 2021a). Otros estudios han confirmado el efecto antimicrobiano de la lignina extraída de diversas fuentes biológicas (de Sousa-Nascimento et al., 2021). Por ello, la incorporación del ECC en películas de G-CMC representa una alternativa de envase con acción fungicida para preservar la vida de anaquel de los alimentos, al controlar el deterioro causado por la proliferación de fitopatógenos.

- gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 189-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.003>
- Benson, N. U., Bassey, D. E., & Palanisami, T. (2021). COVID pollution: impact of COVID-19 pandemic on global plastic waste footprint. *Heliyon*, 7(2), e06343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06343>
- Chaiwarit, T., Masavang, S., Mahe, J., Sommano, S., Ruksiriwanich, W., Brachais, C. H., Chambin, O., & Jantrawut, P. (2020). Mango (cv. *Nam Dokmai*) peel as a source of pectin and its potential use as a film-forming polymer. *Food Hydrocolloids*, 102, 105611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105611>
- de Sousa-Nascimento, L., da Mata-Vieira, F. I., Horácio, V., Pereira-Marques, P., Freitas-Rosa, M., Araújo-Souza, S., Martins-de Freitas, R., Andrade-Uchoa, D. E., Mazzeto, S., Lomonaco, D., & Avelino, F. (2021). Tailored organosolv banana peels lignins: Improved thermal, antioxidant and antimicrobial performances by controlling process parameters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 241-252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.156>
- Dou, L., Li, B., Zhang, K., Chu, X., & Hou, H. (2018). Physical properties and antioxidant activity of gelatin-sodium alginate edible films with tea polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(B), 1377-1383. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121>
- Esteghlal, S., Niakousari, M., & Hashem-Hosseini, S. M. (2018). Physical and mechanical properties of gelatin-CMC composite films under the influence of electrostatic interactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.079>
- Ge, L., Zhu, M., Li, X., Xu, Y., Ma, X., Shi, R., Li, D., & Mu, C. (2018). Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. *Food Hydrocolloids*, 83, 308-316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.052>
- Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1085-1097. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.005>
- Janairo, J. I. (2021). Unsustainable plastic consumption associated with online food delivery services in the new normal. *Cleaner and Responsible Consumption*, 2, 100014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clrc.2021.100014>
- Kan, J., Liu, J., Yong, H., Liu, Y., Qin, Y., & Liu, J. (2019). Development of active packaging based on chitosan-gelatin blend films functionalized with Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) fruit extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 384-392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.155>
- Kchaou, H., Jridi, M., Benbettaieb, N., Debeaufort, F., & Nasri, M. (2020). Bioactive films based on cuttlefish (*Sepia*

Conclusiones

Este estudio reveló que la incorporación del ECC incrementó significativamente el espesor de las películas; además, modificó las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de las películas de G-CMC. El ECC aportó un color marrón a las películas translúcidas, incrementando la opacidad y ejerciendo un efecto protector frente a la luz UV. La microestructura se modificó por la incorporación del ECC; sin embargo, el extracto no afectó la formación y desmolde de las películas. Adicionalmente, los ECC mostraron alta capacidad inhibitoria contra cepas de *R. stolonifer* y *A. niger*. Considerando lo anterior, las películas obtenidas representan un material prometedor como sustituto de los envases convencionales, ya que además de sus características pueden reducir el deterioro de los alimentos ocasionado por hongos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (Proyecto SIP: 20181062 y 20210011) por el financiamiento de este trabajo. Además, la primera autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas del IPN (COFAA) por las becas otorgadas.

Fin de la versión en español

- officinalis*) skin gelatin incorporated with cuttlefish protein hydrolysates: Physicochemical characterization and antioxidant properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100477. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100477>
- Khedri, S., Sadeghi, E., Rouhi, M., Delshadian, Z., Mortazavian, A. M., de Toledo-Guimarães, J., Fallah, M., & Mohammadi, R. (2021). Bioactive edible films: Development and characterization of gelatin edible films incorporated with casein phosphopeptides. *LWT - Food Science and Technology*, 138, 110649. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110649>
- Kowalczyk, D., Pytko, M., Szymanowska, U., Skrzypek, T., Łupina, K., & Biendl, M. (2020). Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends. *Food Hydrocolloids*, 109, 106104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106104>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021a). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Kumar, P., Tanwar, R., Gupta, V., Upadhyay, A., Kumar, A., & Gaikwad, K. K. (2021b). Pineapple peel extract

- incorporated poly (vinyl alcohol)-corn starch film for active food packaging: Preparation, characterization and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 223-231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.136>
- Li, N., Jiang, H., Yang, J., Wang, C., Wu, L., Hao, Y., & Liu, Y. (2021). Characterization of phenolic compounds and anti-acetylcholinase activity of coconut shells. *Food Bioscience*, 42, 101204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101204>
- Luksiene, Z., & Buchovec, I. (2019). Impact of chlorophyllin-chitosan coating and visible light on the microbial contamination, shelf life, nutritional and visual quality of strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 463-472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.02.003>
- Malherbi, N. M., Schmitz, A. C., Grando, R. C., Bilck, A. P., Yamashita, F., Tormen, L., Fakhouri, F. M., Velasco, J. I., & Bertan, L. C. (2019). Corn starch and gelatin-based films added with guabiroba pulp for application in food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 140-146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.008>
- Michelin, M., Marques, A. M., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., & Cerqueira, M. A. (2020). Carboxymethyl cellulose-based films: effect of organosolv lignin incorporation on physicochemical and antioxidant properties. *Journal of Food Engineering*, 285, 110107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110107>
- Mir, S. A., Dar, B. N., Wani, A. A., & Shah, M. A. (2018). Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 141-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.004>
- Nagarajan, M., Benjakul, S., Prodpran, T., & Songtipya, P. (2015). Properties and characteristics of nanocomposite films from tilapia skin gelatin incorporated with ethanolic extract from coconut husk. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 7669-7682. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1905-1>
- Nallan-Chakravartula, S. S., Lourenço, R. V., Balestra, F., Quinta-Barbosa-Bittante, A. M., do Amaral-Sobral, P. J., & Dalla-Rosa, M. (2020). Influence of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaf extract and/or natamycin on properties of cassava starch/chitosan active films. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100498>
- Nazmi, N. N., Isa, M. I., & Sarbon, N. M. (2017). Preparation and characterization of chicken skin gelatin/CMC composite film as compared to bovine gelatin film. *Food Bioscience*, 19, 149-155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.002>
- Nor Adilah, A., Noranizan, M. A., Jamilah, B., & Nur Hanani, Z. A. (2020). Development of polyethylene films coated with gelatin and mango peel extract and the effect on the quality of margarine. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100577>
- Prakash, A., Vadivel, V., Banu, S. F., Nithyanand, P., Lalitha, C., & Brindha, P. (2018). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of solvent extracts of agro-food by-products (cashew nut shell, coconut shell and groundnut hull). *Agriculture and Natural Resources*, 52(5), 451-459. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.10.018>
- Rasid, N. A., Nazmi, N. N., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2018). Rheological, functional and antioxidant properties of films forming solution and active gelatin films incorporated with *Centella asiatica* (L.) urban extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 115-124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.10.002>
- Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2019). Lime peel pectin integrated with coconut water and lime peel extract as a new bioactive film sachet to retard soybean oil oxidation. *Food Hydrocolloids*, 97, 105173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105173>
- Roy, S., & Rhim, J. W. (2020). Preparation of antimicrobial and antioxidant gelatin/curcumin composite films for active food packaging application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188, 110761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110761>
- Sahraee, S., Milani, J. M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2017). Effect of corn oil on physical, thermal, and antifungal properties of gelatin-based nanocomposite films containing nano chitin. *LWT - Food Science and Technology*, 76(A), 33-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.028>
- Sengupta, S., & Basu, G. (2016). Properties of coconut fiber. In: Hashmi, S., & Choudhury, I. A. (Eds), *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* (pp. 263-281). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.04122-9>
- Shikinaka, K., Nakamura, M., & Otsuka, Y. (2020). Strong UV absorption by nanoparticulated lignin in polymer films with reinforcement of mechanical properties. *Polymer*, 190, 122254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122254>
- Tanwar, R., Gupta, V., Kumar, P., Kumar, A., Singh, S., & Gaikwad, K. K. (2021). Development and characterization of PVA-starch incorporated with coconut shell extract and sepiolite clay as an antioxidant film for active food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 451-461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.179>
- Terzioğlu, P., Güneş, F., Parın, F. N., Şen, İ., & Tuna, S. (2021). Biowaste orange peel incorporated chitosan/polyvinyl alcohol composite films for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 30, 100742. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100742>
- Trajkovska-Petkoska, A., Daniloski, D., D'Cunha, N. M., Naumovski, N., & Broach, A. T. (2021). Edible packaging: sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Food Research International*, 140, 109981. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109981>
- Tyufin, A. A., & Kerry, J. P. (2021). Gelatin films: Study review of barrier properties and implications for future studies

- employing biopolymer films. *Food Packaging and Shelf Life*, 29, 100688. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodpack.2021.100688>
- Xu, J., Wei, R., Jia, Z., & Song, R. (2020). Characteristics and bioactive functions of chitosan/gelatin-based film incorporated with polylysine and astaxanthin extracts derived from by-products of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Hydrocolloids*, 100, 105436. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105436>
- Xue, F., Zhao, M., Liu, X., Chu, R., Qiao, Z., Li, C., & Adhikari, B. (2021). Physicochemical properties of chitosan/zein/essential oil emulsion-based active films functionalized by polyphenols. *Future Foods*, 3, 100033. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100033>
- Yang, W., Fortunati, E., Dominici, F., Giovanale, G., Mazzaglia, A., Balestra, G. M., Kenny, J. M., & Puglia, D. (2016). Effect of cellulose and lignin on disintegration, antimicrobial and antioxidant properties of PLA active films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 360-368. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.068>
- Zhang, H., & Sablani, S. (2021). Biodegradable packaging reinforced with plant-based food waste and by-products. *Current Opinion in Food Science*, 42, 61-68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.05.003>