










Antifungal and physicochemical properties of starch-lignin based-films

Propiedades antifúngicas y fisicoquímicas de películas de almidón-lignina

José Luis Espinoza-Acosta¹, Ramsés Ramón González-Estrada², Dora Edith Valencia-Rivera³, Karla Guadalupe Martínez-Robinson⁴, Ana Irene Ledesma-Osuna⁵, Francisco J. Blancas-Benitez², Beatriz Montaña-Leyva^{5*}

¹Universidad Estatal de Sonora, Navojoa, Sonora, C.P. 85875, Mexico. ²División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico de Tepic. C.P. 63175, Mexico. ³Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Caborca, C.P. 86621, Sonora, Mexico. ⁴Laboratorio de Polímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, C.P. 83304, Sonora, Mexico. ⁵Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo, C.P. 83000, Sonora, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: beatriz.montano@unison.mx (B. Montaña-Leyva).

Article history:

Received: 20 June 2023 / Received in revised form: 15 August 2023 / Accepted: 19 August 2023 / Published online: 1 October 2023.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.4.24>

ABSTRACT

Biopolymeric films offer an ecological alternative to obtain containers or coatings for food. These offer a barrier against moisture and are biocompatible. Mixtures of different polymers make it possible to obtain materials with unique physicochemical properties. The objective of this study was to assess the effect of different soluble fraction of organosolv lignin on the antifungal and physicochemical properties of starch films. The lignin was extracted using a mixture of organic solvents, fractionated in alcohol, and the alcohol-soluble lignin fraction was incorporated into starch films at concentrations of 1, 3, 5, and 10 %. The resulting films underwent analysis through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electronic Microscopy (SEM). Additionally, thickness,

color, the mechanical properties, and the inhibition capacity against *P. italicum* fungus of the films were also evaluated. The FTIR and SEM results revealed significant chemical interactions between starch and alcohol-soluble lignin fraction confirming a correct integration of both polymers. Moreover, the incorporation of alcohol-soluble lignin fraction had a plasticizing effect on the films, substantially enhancing their flexibility. Regarding antifungal activity, the films with 5 % alcohol-soluble lignin fraction exhibited the highest percentage of inhibition of the *P. italicum* fungus (91.7 ± 0.56 %), while the lowest inhibition was obtained in the films containing 10 % (64.0 ± 0.32 %). The starch/ alcohol-soluble lignin fraction films demonstrated effective antifungal *in vitro* properties, providing a viable alternative to control the development microorganism that affect the shelf life of foods.

Keywords: Antifungal properties, biofilms, durum wheat, starch, lignin, *Penicillium italicum*.

RESUMEN

Las películas biopoliméricas ofrecen una alternativa ecológica para obtener envases o recubrimientos para alimentos. Estas ofrecen una barrera frente a la humedad y son biocompatibles. Las mezclas de diferentes polímeros permiten obtener materiales con propiedades fisicoquímica únicas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes fracciones solubles de lignina organosolv en las propiedades antifúngicas y fisicoquímicas de películas de almidón. La lignina fue extraída utilizando una mezcla de solventes orgánicos, fraccionada en alcohol, y la fracción de lignina soluble en alcohol (ASL) fue incorporada en películas de almidón en concentraciones de 1, 3, 5, y 10 % (v/v). Las películas resultantes fueron caracterizadas mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, se evaluó el grosor, el color, las propiedades mecánicas y la capacidad de las películas para inhibir el crecimiento del hongo *P. italicum* en experimentos *in vitro*. Los resultados de FTIR y SEM revelaron interacciones químicas significativas entre el almidón y FSL, confirmando una correcta integración de ambos polímeros. La incorporación de FSL tuvo un efecto plastificante en las películas, mejorando considerablemente su flexibilidad. En cuanto a la actividad antifúngica, las películas con un 5 % de ASL mostraron el mayor porcentaje de inhibición del hongo *P. italicum* (91.7 ± 0.56 %), mientras que la menor inhibición se obtuvo en las películas que contenían un 10 % (64.0 ± 0.32 %). Las películas de almidón/FSL demostraron tener propiedades antifúngicas haciendo de estas una alternativa viable para controlar el desarrollo de microorganismos que afectan la vida útil de frutas y hortalizas.

Palabras claves: Almidón, biopelículas, lignina, trigo cristalino, *Penicillium italicum*, propiedades antifúngicas.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades poscosecha en alimentos en fresco generan pérdidas considerables a nivel mundial. Actualmente, su control se basa en el uso de fungicidas sintéticos. No

obstante, el uso indiscriminado de estos compuestos químicos puede causar daños a la salud humana y al ambiente, así como generar cepas resistentes (Angel-Cuapio & Loera, 2016). La aplicación de compuestos bioactivos en la superficie del alimento puede ser una alternativa a los fungicidas sintéticos. Sin embargo, la aplicación directa tiene la desventaja de que las sustancias activas podrían ser neutralizadas al entrar en contacto directo con el alimento. Los recubrimientos biodegradables tienen un alto potencial para incorporar ingredientes activos (e.g. antimicrobianos) que pudieran extender la vida de anaquel del producto y reducir el riesgo de desarrollo de patógenos sin efectos dañinos en la salud humana. Asimismo, al encapsularse los compuestos activos en una matriz polimérica, se pueden controlar las concentraciones de los compuestos antifúngicos, favoreciendo su efecto inhibidor contra microorganismos.

La lignina es el compuesto fenólico natural más abundante en la tierra y se encuentra presente en las paredes celulares de las plantas. En las plantas herbáceas el contenido de lignina se encuentra entre 15 y 40 %. La lignina es un heteropolímero formada principalmente por unidades de fenilpropano provenientes de tres alcoholes aromáticos: alcohol paracumárico (unidad parahidroxifenilo, H), alcohol coniferílico (unidad guayacilo, G) y alcohol sinapílico (unidad siringilo, S) (Yun *et al.*, 2021). Estas unidades aromáticas son conocidas como monolignoles, los cuales se consolidan en la pared celular a través de reacciones enzimáticas y su acoplamiento da como resultado el polímero de lignina que se mantiene unido por una gran variedad de enlaces químicos de tipo éter y enlaces carbono-carbono. La síntesis de lignina produce un polímero aromático con una estructura química altamente heterogénea. La variedad de monómeros y múltiples enlaces son responsables de su complejidad química y estructural. Además, el aislamiento de la lignina aumenta su heterogeneidad debido a las severas condiciones de los procesos, como la adición de agentes químicos y el uso de altas temperaturas. Los procesos convencionales de fabricación de pulpa de celulosa basado en el uso de soluciones alcalinas y el ácido sulfúrico generan ligninas con estructuras químicas complejas y una distribución de peso molecular polidispersa. Esta heterogeneidad y características como mal olor o presencia de impurezas (cenizas, carbohidratos o azufre) han limitado su valorización.

En contraste, las biorrefinerías lignocelulósicas se enfocan en la transformación sostenible y eficiente de la biomasa lignocelulósica en una amplia gama de productos y subproductos de alto valor. Estas biorrefinerías se caracterizan por el uso de solventes orgánicos, líquidos iónicos, y agua, así como pretratamientos físicos para separar a la lignina del resto de componentes de la lignocelulosa. El método de extracción de lignina basado en el uso de solventes orgánicos conocido como organosolv ha ganado considerable atención como una alternativa a los métodos clásicos para remover la lignina. El uso de alcoholes y ácidos orgánicos remueven ligninas con alta grado de pureza, peso molecular uniforme, alta solubilidad y con actividad biológica (Pan *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2012). Estas características pueden facilitar la conversión de lignina en productos de valor agregado. Algunas investigaciones han revelado que la lignina organosolv posee varias actividades biológicas tales como antioxidante, citotóxica y antimicrobiana (García *et al.*, 2010; Javed *et al.*, 2021). Además, se ha reportado que la separación de la lignina organosolv en diversas fracciones puede aún mejorar su actividad biológica. El fraccionamiento mediante extracción sucesiva con solventes

orgánicos, principalmente alcoholes, permite separar ligninas de menor peso molecular, mientras que la lignina con mayor peso molecular se puede recuperar como residuo insoluble. Este enfoque ofrece la ventaja de obtener diferentes componentes de lignina con propiedades específicas, lo que amplía su potencia aplicabilidad en diversas áreas.

Por otro lado, se ha investigado ampliamente al almidón como uno de los mejores candidatos para obtener materiales biodegradables y recubrimientos comestibles, ya que es fácil de procesar, relativo bajo costo y altamente disponible (Vega-López *et al.*, 2016). Hay investigaciones que demuestran que la incorporación de lignina en diferentes almidones permite obtener materiales más resistentes y poco susceptibles a la humedad debido a interacciones químicas y físicas entre la lignina y la matriz polimérica (Yang *et al.*, 2015). También, estos materiales son térmicamente más estables (Ni *et al.*, 2022). La combinación de lignina con polímeros como la gelatina o el quitosano ha permitido obtener resultados prometedores en el desarrollo de biomateriales, aunque en estos estudios se emplearon ligninas parcialmente solubilizada en ácido acético al 80 % y dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente. Por lo tanto, es importante considerar la aplicación final que tendrán estos materiales y evitar el uso de productos químicos tóxicos en biomateriales que podrían ser destinados para aplicaciones alimentarias.

Estudios recientes revelaron que las fracciones de bajo peso molecular de lignina organosolv presentan actividad antioxidante y antimicrobiana debido a la abundancia de grupos hidroxilo fenólicos en comparación con ligninas de alto peso molecular. En un estudio previo, nuestro grupo de trabajo reportó que fracciones de lignina organosolv solubles en metanol confirieron actividad antioxidante a películas de almidón de trigo, lo que hizo a estos materiales potencialmente útiles para empaques de alimentos. Recientemente, Ishimaru *et al.* (2023) reportaron que fracciones de lignina organosolv solubles en n-hexano fueron eficientes para inhibir el crecimiento del hongo *Trametes versicolor*. Estos hallazgos sugieren que la incorporación de fracciones de lignina organosolv en películas y envases basados almidón pueden conferir propiedades útiles para la conservación de alimentos y la protección contra el deterioro microbiano. No obstante, actualmente no existen estudios que reporten el uso de fracciones de lignina organosolv para fabricar películas de almidón con propiedades antifúngicas contra el hongo *Penicillium italicum*. El objetivo de este estudio fue elaborar películas de almidón de trigo incorporando diferentes concentraciones de fracciones de lignina organosolv solubles en metanol y analizar el efecto en sus propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas para determinar su uso potencial como material de empaque para productos hortofrutícolas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aislamiento del almidón

Se utilizó trigo cristalino (*Triticum durum*) de la variedad Patronato Oro C2008. La extracción y purificación del almidón se realizó siguiendo el método de molienda húmeda descrita por Vansteelandt & Delcour (1999). Inicialmente, 100 g de grano de trigo fueron puestos en una solución de bisulfito de sodio (0.24%) (Baker) durante 36 h a 30 °C.

Enseguida, el grano se maceró manualmente mezclándose con agua destilada. La mezcla se pasó a través de tamices (45 y 63 μm) enjuagándose con agua destilada. La mezcla resultante fue centrifugada a 1800 g durante 20 min y enseguida se decantó. Las capas formadas en la superficie (color amarillo-café) fueron desechadas. Este procedimiento se repitió tres veces o hasta que la capa formada no fuera visible. Los lípidos fueron eliminados suspendiendo el almidón en metanol al 80%, (Baker) agitándose durante dos horas. A continuación, la mezcla se filtró y lavó tres veces con el solvente. Por último, la muestra se dejó secar a temperatura ambiente (24 h) y el almidón se guardó en frascos de polietileno.

2.2 Extracción de la lignina

Inicialmente, los residuos agrícolas de trigo cristalino se molieron en un molino de cuchillas (Pulvex, Modelo 200, México). Para homogenizar el tamaño de partícula, la muestra fue pasada por mallas número 20 (850 μm) y 30 (600 μm). Las muestras fueron desgrasadas con éter de petróleo (Fermont). La extracción de la lignina se realizó por un método con solventes orgánicos (organosolv) el cual ha demostrado que extrae ligninas con alta actividad biológica. El método seguido fue el descrito por Xu *et al.* (2006). A 10 g de muestra, se le añadió una solución de ácido fórmico (Baker), ácido acético (Meyer) y agua (30:60:10, v/v/v) con relación sólido/líquido 20:1 (mL/g). Las muestras fueron colocadas en un baño de agua (85 °C) con agitación constante durante 4 horas. Enseguida, la fase líquida y sólida fue separada pasando la muestra por una tela de nylon. La fase sólida fue considerada como celulosa. La fase líquida formada por los solventes, hemicelulosas y lignina (licor de cocimiento) fue concentrada utilizando un rotaevaporador (Marca Yamato modelo RE301). Una vez concentrado, a la fase líquida se añadieron tres volúmenes de etanol (FagaLab) al 95% v/v y se dejó reposar (12 h a temperatura ambiente) para precipitar los carbohidratos provenientes de la hemicelulosa. Este paso fue repetido tres veces. Los carbohidratos precipitados se removieron por filtrado (filtros Whatman de 47 mm), lo retenido en el filtro fue considerado como hemicelulosa. El líquido color café oscuro obtenido después del filtrado, se concentró nuevamente y se consideró como lignina organosolv. Por último, la lignina se sometió a un lavado con agua destilada utilizando una relación 1:50 v/v colocándolo en un tubo de 50 mL. Se añadió la lignina y se aforó con agua destilada y posteriormente se centrifugó (Thermo Scientific, Biofuge Primo R.) a 10000 g durante 10 min. Después, se decantó el sobrenadante y en el mismo tubo se añadió un mililitro más de lignina. Enseguida se aforó con agua destilada y se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos. El tubo fue decantado nuevamente y los últimos pasos se repitieron dos veces más. Por último, la lignina organosolv se recuperó y se secó en una estufa (Boekel Scientific, 107801) a 30° C durante 12 h.

2.3 Preparación de las películas de almidón/lignina

Las películas de almidón y lignina se obtuvieron por el método de evaporación de solventes (casting) siguiendo los métodos de Montaña-Leyva *et al.* (2008) y Espinoza-Acosta *et al.* (2015). Inicialmente se preparó una suspensión de almidón-agua (3% p/v) y se calentó en un baño de agua (marca Yamato, modelo BT-25) a 80° C durante 1 h. La suspensión de almidón, una vez disuelta, se colocó en una olla de presión (Ecko) a 121°

C por 20 min. Se utilizó glicerol (Sigma Aldrich) como plastificante (40% p/p, basándose en el contenido del almidón) y se homogenizó durante 10 min. Para la incorporación de la lignina en las películas de almidón, ésta fue sometida a un proceso de fraccionación en alcohol. Estudios previos realizados por Espinoza-Acosta *et al.* (2015) encontraron que la lignina organosolv de paja de trigo presenta una alta solubilidad en metanol (superior al 50 % p/v). Por dicha razón, la lignina fue suspendida en metanol (Baker) a temperatura ambiente y se disolvió durante 30 min usando un vortex. Enseguida se centrifugó a 10,000 g por 10 min. La fracción soluble de la lignina fue separada de la insoluble por decantación. La fase soluble obtenida se sometió nuevamente al proceso de fraccionación en metanol. Las dos fracción soluble de lignina se mezclaron antes de ser utilizadas para elaborar las películas de almidón. La fracción soluble de lignina (FSL) se añadió en concentraciones de 1, 3, 5 y 10 % (p/v basándose en el contenido de almidón). Finalmente, en una caja de Petri (6 cm de diámetro) fueron vertidos 6 g de la solución formadora de película y se dejaron secar a 60°C por 8h. Durante este tiempo el metanol residual en las películas es evaporado. Después del secado, las películas fueron acondicionadas al 57% de humedad relativa (solución saturada de bromuro de sodio, Meyer) durante 72 h a temperatura ambiente.

2.4 Espesor y color de las películas

El espesor de las películas se evaluó con un micrómetro manual (Mitutoyo Co, Tokyo, Japón) de manera aleatoria en 10 diferentes zonas de cada película (n=10) y se registraron los valores promedios. El color en las películas se midió con un colorímetro (Hunter CM-3500d, Minolta Co. Ltd, Osaka, Japón) basándose en los parámetros (L^* , a^* y b^*). Se utilizó una hoja de papel blanca como fondo ($L_o^* = 88.70 \pm 0.07$, $a_o^* = 2.92 \pm 0.03$, $b_o^* = -13.57 \pm 0.05$). Las mediciones se realizaron por triplicado en tres posiciones aleatorias en la superficie de las películas. En la escala de color Hunter, el máximo valor y mínimo para L^* es 100 y 0, respectivamente. Positivo a^* es considera rojo y a^* negativa, verde. L^* , a^* y b^* positiva es considerada amarillo y la b^* negativa, azul. Asimismo, los parámetros del color fueron expresados como (ΔE), definida como la diferencia total de color (Angellier-Coussy *et al.*, 2008):

$$\Delta E = [(L^* - L_o^*)^2 + (a^* - a_o^*)^2 + (b^* - b_o^*)^2]^{0.5}$$

2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de la superficie de las películas fue observada por medio de un microscopio electrónico de barrido (JOEL JSM-5800LV, Tokyo, Japan). Para la visualización de la superficie de las películas, las muestras fueron montadas en cápsulas de aluminio usando una cinta de doble cara y fueron recubiertas con una capa de oro (40–50 nm). Todas las muestras fueron examinadas usando una aceleración de voltaje de 15 kV.

2.6 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros de absorción de infrarrojo usando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR-Attenuated Total Reflection) en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet iS-50 (Thermo Scientific, Madison, WI. USA.) Se registraron 64 escaneos para cada espectro en el rango de detección de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

2.7 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas fueron evaluadas por el esfuerzo de tensión (MPa), la elongación o deformación (%) y el módulo de Young (MPa). El esfuerzo de tensión se define como el máximo esfuerzo que una película puede soportar y se calculó dividiendo la carga máxima por el área de la sección transversal de la muestra inicial. La elongación se define como el porcentaje de cambio en la longitud del espécimen con respecto a la longitud original. El módulo de Young se obtuvo a partir de la pendiente lineal inicial de la curva de esfuerzo-deformación. Las propiedades mecánicas fueron determinadas en texturómetro (TAXT plus, Vienna Court, Surrey, UK). Las medidas de las muestras fueron 4.0 x 1.0 cm (largo y ancho, respectivamente) y se sometieron a una fuerza de tensión con una velocidad de cabezal de 1 mm/min. La celda de carga utilizada fue de 50 N de fuerza y la separación entre mordazas de 2 cm. Los valores son la media de la evaluación de 10 especímenes.

2.8 Actividad antifúngica de las películas

Para evaluar la capacidad antifúngica de las películas se utilizó el hongo fitopatógeno *Penicillium italicum* causante del moho azul y principal responsable en la pérdida postcosecha en cítricos. Este, fue previamente cultivado en agar papa dextrosa (APD DifcoMR) a 27 °C durante 7 días y el efecto de la película en la inhibición de la formación del tubo germinativo del hongo se evaluó siguiendo el método de González-Estrada *et al.* (2018). Inicialmente se añadió una solución de esporas (1×10^5 esporas/mL) en discos con APD de 1 cm de diámetro y se dejó secar el inóculo durante 15 minutos. Posteriormente se cubrieron los discos con las películas de almidón/lignina y se incubaron a 27°C por 12 h. Como control se utilizaron discos de APD inoculados con la solución conocida de esporas y sin películas. Enseguida, se retiraron las películas para determinar el porcentaje de germinación del hongo por microscopía óptica mediante la observación del tubo germinativo (se consideraron esporas germinadas cuando la longitud del tubo germinativo era igual o más largo que el diámetro de la espora). El porcentaje de inhibición de germinación fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Número de EG control} - \text{Número de EG tratamiento}}{\text{Número de EG control}} \times 100$$

Donde:

EG = Esporas germinadas.

2.9 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se aplicó un diseño unifactorial y un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con el método Tukey ($p > 0.05$) utilizando el programa Minitab Statistical Software®.

3. RESULTADOS

3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y características físicas

En general, las películas fueron visiblemente homogéneas sin separación de fases. El espesor promedio se encontró alrededor de 0.078 ± 0.005 mm. La incorporación de la fracción soluble de lignina no tuvo efecto en el espesor final de las películas. La obtención de materiales con aporte de color pueden reducir la exposición a la luz, evitando así los daños oxidativos en productos alimenticios (Vargas-Torrico *et al.*, 2021). Por lo antes mencionado se evaluaron los cambios de color en las películas de almidón al incorporar diferentes concentraciones de FSL. En la Fig. 1 se muestra los cambios de color en las películas que contenían lignina. El efecto de la adición de lignina en las películas de almidón sobre los parámetros de color (L^* , a^* , b^* y ΔE) se muestran en la Tabla 1. Las películas de almidón nativo tuvieron la más alta luminosidad (L^*) aunque no fueron totalmente transparentes (Bhat *et al.*, 2013). También, se obtuvo una disminución en el valor de L^* en todas las películas, lo cual significa que las películas se tornaron más oscuras a medida que se incrementó el contenido de FSL. Asimismo, en las películas con mayor concentración de FSL (10 %) se observó un incremento en los valores de a^* y b^* , indicando que el color de las películas se tornó hacia la zona de color amarillo-café. El valor de ΔE (Tabla 1) demuestra el cambio total del color en las películas, confirmando que mientras mayor es el contenido de lignina, mayor es el cambio de color con respecto a la matriz de almidón. En la Fig. 2 se muestra las micrografías de la película de almidón nativo (FSL 0 %) y las películas con 5 y 10 % de FSL. Se observa una superficie relativamente homogénea en todas las películas sin separación de fases lo cual indica la completa solubilización del almidón, así como la completa incorporación del plastificante y de la FSL.

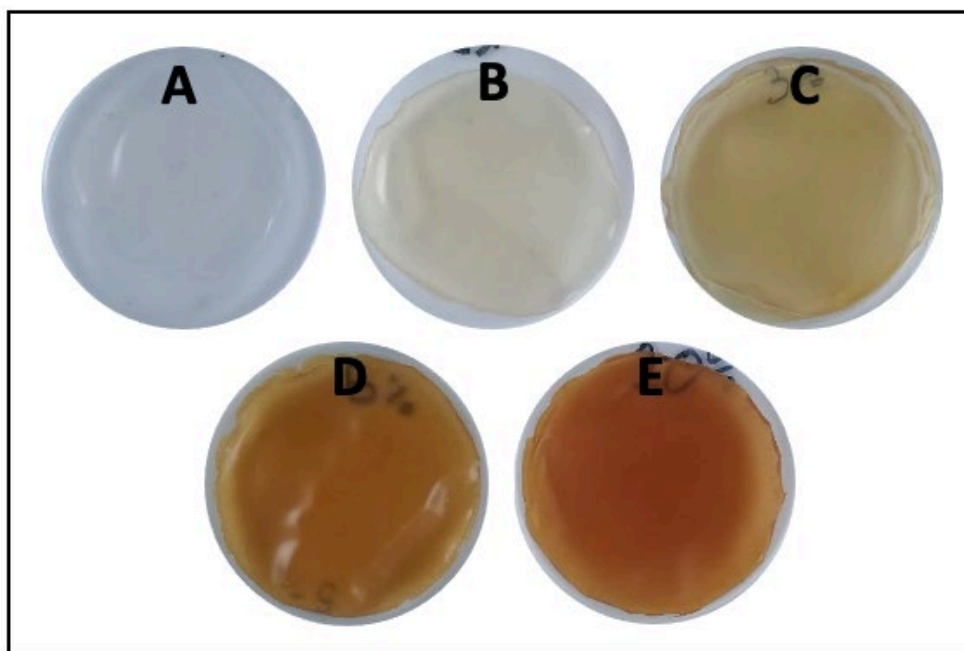


Fig. 1. Cambio de color en las películas de almidón/lignina: (A) 0 % lignina (almidón nativo); (B) 1 %, (C) 3 %, (D) 5 % y (E) 10 % de lignina.

Fig. 1. Color change in starch/lignin films: (A) 0 % lignin (native starch); (B) 1 %, (C) 3 %, (D) 5 % and (E) 10 % lignin.

Tabla 1. Evolución de color en las películas de almidón/lignina.

Table 1. Color evolution in starch/lignin films.

Contenido de lignina (%)	L^*	a^*	b^*	ΔE
0	86.98 ± 0.35	2.31 ± 0.05	-12.32 ± 0.27	2.23 ± 0.24
1	80.45 ± 0.40	0.13 ± 0.10	14.95 ± 0.90	29.51 ± 1.04
3	69.08 ± 0.33	6.59 ± 0.28	39.64 ± 0.31	56.63 ± 0.42
5	61.90 ± 0.22	13.02 ± 0.49	45.98 ± 0.43	66.22 ± 0.33
10	52.70 ± 0.71	20.13 ± 0.26	49.03 ± 0.62	73.98 ± 1.01

Valores promedio de tres mediciones y su desviación estándar.

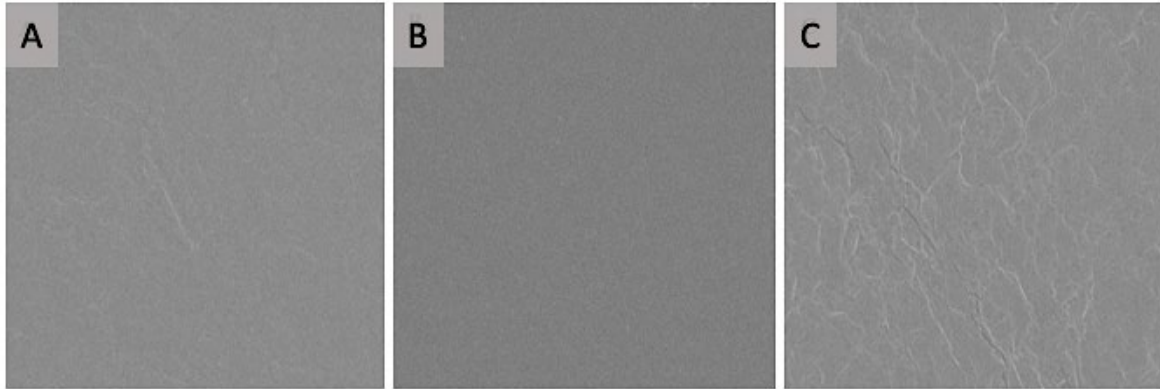


Fig. 2. Micrografías de las películas de almidón/lignina: (A) 0 % FSL(almidón nativo), (B) 5 % FSL y (C) 10 % FSL.

Fig. 2. Micrographs of the starch/lignin films: (A) 0 % FSL (native starch), (B) 5 % FSL and (C) 10 % FSL.

3.2 Espectroscopia de infrarrojo de las películas almidón/lignina

El estudio de los espectros de infrarrojo se llevó a cabo para determinar las interacciones entre los polímeros de almidón, lignina y el resto de los componentes implicados en la formación de las películas. En la Fig. 3 se muestran los espectros de absorción de las películas de almidón/lignina, así como de la fracción soluble de lignina (FSL) que fue adicionada a las películas. En la FSL (Fig. 3A) se observa una banda alrededor de los 3280 cm^{-1} , la cual es típica de los grupos hidroxilo (estiramiento O-H) en estructuras fenólicas y alifáticas, mientras que la banda a los 2931 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del estiramiento $\text{sp}^3\text{ C-H}$ de los grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y grupos metileno ($=\text{CH}_2/-\text{CH}_2-$). Se observaron bandas en los 1590 cm^{-1} y 1516 cm^{-1} correspondientes al estiramiento $\text{C}=\text{C}$ del esqueleto aromático de fenilpropano. Estas bandas características de la estructura química de la lignina han sido reportadas anteriormente. El estiramiento C-H de las unidades de guayacil (G) se muestra a los 1245 cm^{-1} . La banda presente a los 1162 cm^{-1} es característica de la presencia de las unidades de lignina H, G y S (Prasetyo *et al.*, 2020). Estos resultados corroboran la presencia de las tres unidades aromáticas en la lignina organosolv soluble en alcohol, así como la existencia de enlaces que mantienen unidos a grupos funcionales que proveen de actividad biológica a la lignina.

En el espectro correspondiente a la matriz de almidón (Fig. 3B), se observa una banda ancha entre los 3400 y 3200 cm^{-1} atribuida a la vibración de estiramiento de los grupos -OH. Los picos a los 2926 y 2884 cm^{-1} se relacionan con el estiramiento C-H. El pico a los 1640 cm^{-1} se atribuye a la vibración de flexión del agua absorbida. Las bandas observadas alrededor de los 1411 cm^{-1} corresponden a los enlaces $-\text{OH}$. Los picos a los 1155 y 1050 cm^{-1} se atribuyeron al estiramiento de los enlaces C-O en el almidón y de los enlaces glucosídicos, respectivamente (Kaewtatip & Thongmee, 2013; Hakimi *et al.*, 2021). Los espectros correspondientes a las películas de almidón con FSL mostraron ligeros cambios en las características de las bandas en la región entre los 1700 cm^{-1} y

los 1430 cm^{-1} . Esta variación se acentúa con el mayor contenido de lignina (10 % Fig. 3F), indicando posibles interacciones intra e intermoleculares entre los grupos -OH de los compuestos.

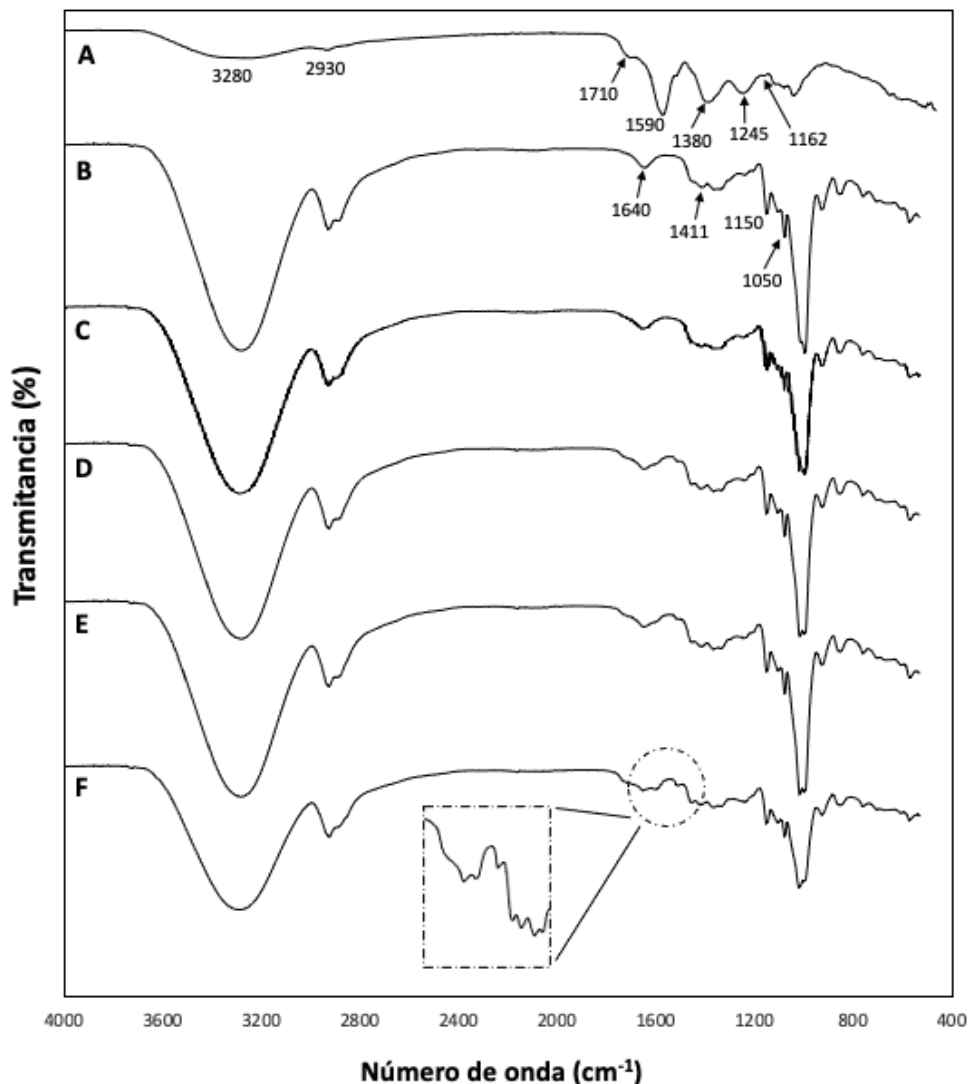


Fig. 3. Espectros de infrarrojo de: (A) fracción soluble de lignina (FSL); (B) película de almidón nativo (0%); (C) 1 %; (D) 3 %; (E) 5 % y (F) 10 % de FSL.

Fig. 3. Infrared spectra of: (A) soluble fraction of lignin (FSL); (B) native starch film (0%); (C) 1 %; (D) 3 %; (E) 5 % and (F) 10 % of FSL.

3.3 Propiedades mecánicas de las películas almidón/lignina

La Fig. 4 muestra las gráficas de esfuerzo-deformación de las películas de almidón/lignina. El esfuerzo de tensión, elongación y Módulo de Young fueron calculados

a partir de las gráficas que se muestran en la Tabla 2. La película de almidón nativo mostró el comportamiento de un material quebradizo (alto esfuerzo de tensión y módulo de Young y baja elongación). En la Tabla 2 se observa que la película de almidón nativo (0 % de FSL) presentó el mayor esfuerzo de tensión (3.41 ± 0.11) y Módulo de Young (0.270 ± 0.025). La adición de la FSL disminuyó significativamente el esfuerzo de tensión de todas las películas. La deformación al corte aumentó en las películas con 1, 3 y 5 % de FSL. El mayor valor de elongación fue observado cuando se incorporó el 5 % de FSL (65.39 ± 0.17) aumentando un 66% con respecto a la película con 0 % FSL (39.27 ± 4.54). Por el contrario, en la película con el 10 % de FSL, la elongación disminuyó en un 60 % (23.84 ± 4.37). El módulo de Young de las películas con FSL fue significativamente menor que la película del almidón nativo, indicando que las películas se volvieron menos rígidas.

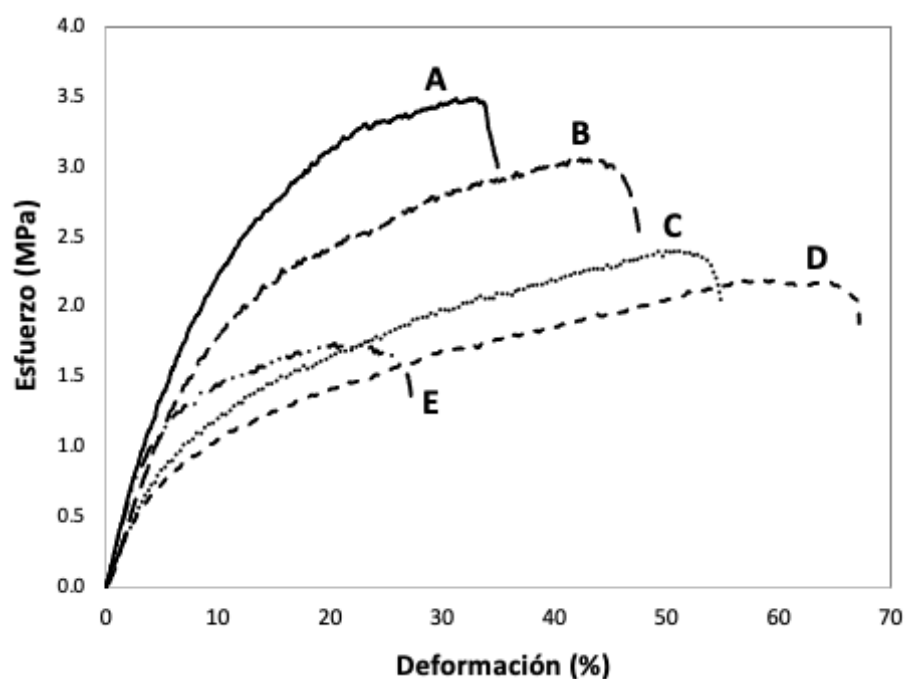


Fig. 4. Gráficas de esfuerzo-deformación de las películas de: (A) almidón nativo (0% FSL) y con (B) 1 %; (C) 3 %; (D) 5 % y (E) 10 % de FSL.

Fig. 4. Stress-strain curves of films: (A) native starch (0%) and (B) 1 %; (C) 3 %; (D) 5 % and (E) 10 % of FSL.

Tabla 2. Propiedades mecánicas de las películas de almidón/lignina.
Table 2. Mechanical properties of starch/lignin films.

Contenido de FSL (%)	Esfuerzo de tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (MPa)
0	3.41 ± 0.11 ^a	39.27 ± 4.54 ^b	0.270 ± 0.025 ^a
1	2.74 ± 0.43 ^b	42.46 ± 7.24 ^b	0.163 ± 0.062 ^b
3	2.42 ± 0.19 ^b	49.60 ± 4.39 ^b	0.174 ± 0.030 ^b
5	2.07 ± 0.22 ^b	65.39 ± 0.17 ^a	0.173 ± 0.013 ^b
10	1.19 ± 0.36 ^c	23.84 ± 4.37 ^c	0.191 ± 0.071 ^{ab}

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05).

3.4 Actividad antifúngica de las películas

Los resultados del porcentaje de inhibición del hongo fitopatógeno *P. italicum* en las películas de almidón/lignina se muestran en la Tabla 3. El porcentaje máximo de inhibición fue observado en las películas que contenían 3 y 5 % de FSL (90.2% y 91.7 %, respectivamente). Por el contrario, el porcentaje de inhibición más bajo lo presentaron las películas con 10 % de FSL. Del mismo modo, en la Fig. 5C y 5D se observa que las películas con el 3 y 5% de FSL disminuyeron la germinación de esporas.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del *P. italicum* en películas de almidón con diferentes concentraciones de FSL.

Table 3. Percentage inhibition of *P. italicum* in starch films with different concentrations of FSL.

Contenido de FSL	Inhibición (%)
Control*	0.00 ± 0.00 ^e
0%	70.7 ± 0.50 ^c
1%	83.6 ± 0.25 ^b
3%	90.2 ± 1.50 ^a
5%	91.7 ± 1.20 ^a
10%	64.0 ± 2.25 ^d

*Hongo *P. italicum* sin película.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05).

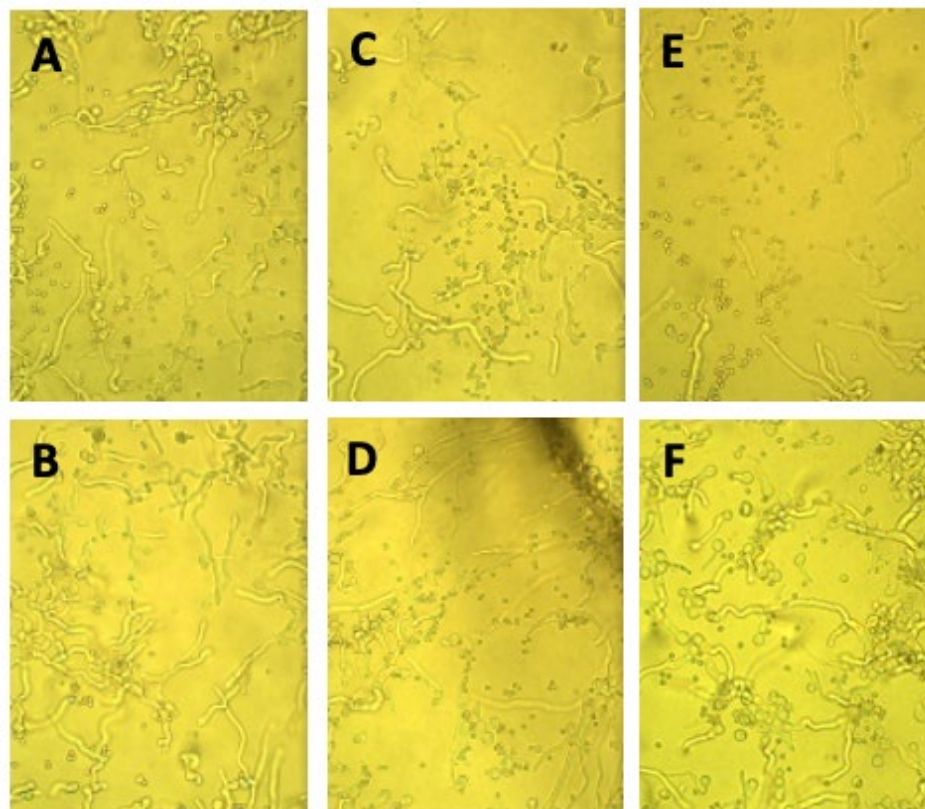


Fig. 5. Imágenes de microscopio de la germinación de esporas. (A) control sin película (hongo *P. italicum*); (B) película de almidón 0%; película de almidón con (C) 1 %; (D) 3 %; (E) 5 % y (F) 10 % de fracción soluble de lignina.

Fig. 5. Microscope images of spore germination. (A) control without film (*P. italicum* fungus); (B) starch film (0 %); starch films with (C) 1 %; (D) 3 %; (E) 5 % and (F) 10 % of soluble lignin fraction.

4. DISCUSIÓN

El color en los empaques de alimentos es un parámetro importante en términos generales de apariencia y aceptación del consumidor. Visiblemente las películas de almidón-FSL resultaron más oscuras a mayor contenido de lignina (Fig. 1). Esto fue confirmado por un aumento en el valor del cambio total de color (ΔE). Resultados similares fueron reportados en películas de almidón de sagú-lignina (Bath *et al.*, 2013) y películas con base de gelatina-lignina (Nuñez-Flores *et al.*, 2013). La lignina contiene grupos cromóforos que absorben la luz en la región UV y visible del espectro (Kim *et al.* 2023). Dichos cromóforos son los responsables de impartir el color característico de la lignina cuando esta se mezcla con otros polímeros.

En la madera, la lignina es casi incolora, mientras que las ligninas industriales obtenidas a través de procesos como el proceso kraft tienen un color oscuro intenso debido a los diversos cambios químicos que ocurren durante el proceso de extracción y a la presencia

de impurezas (Atik & Balaban Ucar 2003; Wang *et al.* 2016). Por lo general, la lignina organosolv puede presentar colores que van desde amarillo claro a marrón ligeramente oscuro (Zhang *et al.* 2020). Este color es atribuido a las condiciones de extracción (temperatura, tipo de solvente y pH) menos severas que se utilizan durante el proceso de extracción organosolv. Sin embargo, incluso dentro de la categoría de lignina organosolv, puede haber variación en el color debido a diferentes parámetros de extracción y fuentes de materia prima.

Se han realizado investigaciones que mencionan que películas con base en almidón y lignina presentan gran potencial para ser utilizadas en la producción de empaques biodegradables activos para la conservación de alimentos con alta tasa de oxidación (Marques de Farias *et al.* 2021; Sun *et al.* 2023). Además, en la conservación de alimentos la prevención de la contaminación microbiológica es un aspecto fundamental para asegurar la calidad de los alimentos. Por tal motivo, este trabajo se centró en elaborar películas con base de almidón adicionadas con lignina y su potencial para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Penicillium italicum*. La incorporación de fracciones solubles de lignina permite desarrollar materiales apropiados para su aplicación en empaques alimentarios. Estas fracciones de lignina poseen características que pueden ofrecer protección contra la radiación ultravioleta (UV), reducir o evitar la oxidación de los alimentos y prevenir la contaminación microbiana, donde el color característico de la lignina juega un papel importante.

De acuerdo con las micrografías de SEM (Fig. 2) las películas almidón/lignina mostraron una superficie homogénea, lo que indica la completa solubilización del almidón, así como la incorporación del plastificante. Cabe señalar que cuando el 5 % de la FSL fue incorporada a la película de almidón, la superficie se volvió más homogénea. En un estudio previo se encontró que fracciones de lignina solubles en metanol tienen un efecto plastificante, lo que mejora la dispersión de los componentes de la película (Espinoza Acosta *et al.* 2015). Por el contrario, cuando se añadió 10 % de FSL a la película de almidón la superficie se tornó ligeramente rugosa. Este resultado puede estar relacionado con una posible agregación de las moléculas de lignina dentro de la matriz de almidón.

La técnica de FTIR es un método no destructivo que se utiliza frecuentemente para estudiar las propiedades fisicoquímicas de los materiales (Almedar & Sain, 2008). Las bandas características de la fracción soluble de lignina aparecen en la Fig. 3. La aparición de estos picos (correspondientes al anillo aromático) sugieren que el núcleo aromático de las ligninas de trigo se mantuvo incluso usando soluciones de ácidos y altas temperaturas. Durante la hidrólisis ácida en el proceso organosolv, se generan grupos carbonilos los cuales dieron señal a la banda en los 1710 cm^{-1} . Asimismo, en la estructura de la lignina se produce cierto grado de oxidación durante el tratamiento con ácidos orgánicos. La banda observada a los 1380 cm^{-1} muestra que dicha oxidación se da principalmente en la posición gamma de la cadena lateral en la estructura de la lignina (Xu *et al.*, 2006). La banda presente a los 1162 cm^{-1} indica que la lignina de trigo organosolv obtenida en este estudio presenta las tres unidades monoméricas principales; p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), en la cadena del polímero de lignina. Estos resultados concuerdan con los encontrados por de Sousa Nascimento *et al.* (2021)

quienes extrajeron lignina a partir de cáscara de banana por un método organosolv y observaron una banda a los 1169 cm^{-1} característica de las ligninas tipo HGS. Lo cual demuestra que con este proceso se pueden extraer ligninas conservando la mayor parte de su estructura original.

En los espectros de las películas de almidón/lignina se observaron ligeros cambios en las características de las bandas en la región entre los 1700 cm^{-1} y los 1430 cm^{-1} . Este fenómeno indica las interacciones formadas entre la lignina y la matriz de almidón, así como un posible cambio en la configuración molecular del almidón. Dicho comportamiento ha sido previamente descrito en películas de almidón de maíz adicionadas con nanopartículas de lignina (Ni *et al.*, 2022). Del mismo modo, en el espectro de la película con 10 % de FSL, se observó una disminución en la intensidad de la banda presente a los 3280 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de flexión de los grupos H-O-H. Este comportamiento puede estar relacionado con un aumento en la hidrofobicidad de la película cuando se adiciona mayor contenido de lignina.

Las propiedades mecánicas de las películas fueron evaluadas mediante pruebas de tensión a 25 °C y 57 % de humedad relativa. En los resultados (Fig. 4) se observa que cuando se adiciona la FSL a las películas de almidón el esfuerzo de tensión y el módulo de Young disminuyen, mientras que la deformación aumenta, características que representan a los materiales dúctiles. Como se muestra en la Tabla 2, la incorporación de la FSL en la película de almidón aumentó la elongación para todas las muestras, a excepción de la película con 10 % de FSL, la cual presentó una elongación menor a las películas con 0 % de FSL. La presencia del 5 % de FSL dio como resultado la mayor elongación, lo cual es un indicador importante de la tenacidad del material. Se ha demostrado que el uso de plastificantes reduce las interacciones directas entre los polímeros y aumentan la movilidad de las cadenas, haciendo las películas más flexibles. La lignina es considerada un macropoliol y se sabe que fracciones de bajo peso molecular pueden actuar como polioles (Baumberger *et al.* 1998). Los polioles como el glicerol y el sorbitol son compuestos químicos usados frecuentemente como plastificantes en películas de almidón (Espinoza-Acosta *et al.*, 2015). En este estudio las fracciones de lignina solubles en alcohol otorgaron un efecto plastificante provocando un aumento de la elongación en las películas con 5 % de FSL. Esta teoría concuerda con lo observado en las micrografías por SEM (Fig. 2) donde la superficie de las películas con 5 % de FSL fue más homogénea debido a la integración de todos los componentes de la película.

Las películas adicionadas con el 10 % de FSL presentaron la menor elongación y esfuerzo de tensión. Este comportamiento es posiblemente debido al aumento del número de interacciones intermoleculares en la lignina. Como consecuencia, disminuye la interacción con las cadenas del almidón, lo cual se refleja en una reducción del esfuerzo de tensión y el módulo de Young. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Chen *et al.* (2006) quienes reportaron que, en películas de proteína de soya, el esfuerzo de tensión disminuía cuando se adicionaban concentraciones de lignina por encima del 6 %. Un comportamiento similar fue observado por Huang *et al.* (2003) tras adicionar diferentes concentraciones de lignina en películas de aislado de proteína de soya. Ellos observaron que una concentración mayor del 10% de lignina resultaba en

la disminución de la deformación al corte de la película. En un estudio de Duval *et al.* (2013) sobre películas de gluten de trigo, se encontró que cuando se adicionó un 15 % de lignina de tipo Kraft, éstas se volvían más rígidas. Estas diferencias encontradas en los resultados demuestran la complejidad de las interacciones entre los diferentes tipos de polímeros y la lignina. De igual forma, se ha reportado que las propiedades funcionales de las películas pueden ser atribuidas, y van a depender de las diferentes características químicas y estructurales de la lignina. Como lo es, el peso molecular (Mw), el índice de polidispersidad (PDI), así como del contenido y distribución de los grupos funcionales (Bendary *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). De acuerdo con nuestros resultados, cuando 5% de lignina es adicionada a las películas de almidón nativo, se puede mejorar la flexibilidad debido a su efecto plastificante. Sin embargo, en cantidades del 10% se presenta una degradación de las propiedades mecánicas de las películas como posible consecuencia de las interacciones y la aglomeración de la lignina. Este efecto concuerda con lo observado en los espectros de infrarrojo de las películas (Fig. 3).

Debido a la presencia de los grupos hidroxilo fenólicos, grupos carboxilo, carbonilo y metoxilo, la lignina posee capacidad antioxidante y antimicrobiana (Espinoza-Acosta *et al.*, 2016; Figueiredo *et al.*, 2018). Aunque, estas propiedades biológicas van a depender del número y tipo de grupos funcionales, del peso molecular, y del método de extracción (Li *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2021). Los polifenoles en la lignina tienen influencia en la deconstrucción de las paredes celulares, dificultando el crecimiento de los microorganismos y su reproducción (Coral-Medina *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2020). En general, la incorporación de FSL en las películas de almidón otorgó propiedades antimicrobianas a las películas elaboradas. La capacidad de lignina para inhibir el crecimiento de varios tipos de bacterias ha sido ampliamente estudiada durante más de una década y se han propuesto varios mecanismos de acción de lignina para inhibir la proliferación de bacterias (Yun *et al.*, 2021). No obstante, en lo que respecta al estudio del efecto de fracciones solubles de lignina organosolv en la inhibición del crecimiento de hongos es limitada. Además, el efecto antifúngico de películas basados en almidón y lignina no ha sido reportado. Recientemente, un estudio relacionado reportó que una fracción de lignina organosolv soluble en n-hexano presentó mayor actividad antifúngica contra el hongo de la pudrición blanca *Trametes versicolor* que fracciones solubles e insolubles en acetato de etilo (Ishimaru *et al.* 2023). El efecto antifúngico de esa fracción fue atribuido al mayor contenido de grupos hidroxilo fenólicos, sin embargo, el mecanismo para explicar el comportamiento antifúngico de esta lignina no fue reportado.

Las películas adicionadas con el 10 % de FSL presentaron menor inhibición de *Penicillium italicum* que el resto de las concentraciones. Este comportamiento concuerda con Alzagameen *et al.* (2018) quienes estudiaron el efecto de la adición de lignina en películas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Sus resultados mostraron que, a mayor contenido de lignina, la actividad biológica en la película se veía disminuida. Ellos afirmaron que, durante la formación de la película, la lignina reacciona con la matriz formando uniones ésteres o éteres. Por su estructura química, la lignina es en cierto grado reactiva donde se encuentran los grupos hidroxilo fenólicos libres (-OH). Sin embargo, no todos los grupos fenólicos tienen la capacidad de reaccionar con radicales libres. Cuando se añaden altas concentraciones de lignina, la interacción inter e

intramolecular puede aumentar, convirtiendo los grupos fenólicos OH a grupos éter o éster o incluso reaccionando entre sí. Como resultado, puede disminuir el número de grupos -OH activos, disminuyendo, por lo tanto, la actividad biológica. En este estudio se encontró que la actividad antifúngica de la película disminuyó con el mayor contenido de lignina (10%) como consecuencia de la interacción entre las moléculas de lignina y las del almidón anteriormente explicada, además del posible entrecruzamiento y agregación de la lignina. Estos resultados son consistentes con lo observado en las propiedades mecánicas y en FTIR.

Los resultados encontrados en este estudio muestran que la incorporación de fracciones solubles de lignina permite desarrollar materiales con aplicaciones en empaques alimentarios. Las películas flexibles con base de almidón y fracciones de lignina pueden ofrecer algunos beneficios como, adaptarse a la forma del alimento, conservar su frescura, ligereza y sostenibilidad. La presencia de lignina en dichas películas además puede impartir protección contra la radiación UV, reducir o evitar la oxidación por su efecto antioxidante y prevenir el crecimiento microbiano en frutos que pudieran ser afectadas por el hongo fitopatógeno *Penicillium italicum*. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos se sugiere llevar a cabo investigaciones adicionales. Se considera imperante la implementación de tecnologías que contribuyan a la simplificación del proceso de extracción de lignina organosolv, como por ejemplo el uso de pulsos ultrasónicos. Del mismo modo, es necesario investigar la efectividad antimicrobiana de las fracciones de lignina organosolv en diferentes tipos de hongos que afecten a frutas y hortalizas.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Alemdar A. & Sain M. 2008. Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*. 68(2): 557-565. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2007.05.044>

Alzagameem A., Khaldi-Hansen B. E., Büchner D., Larkins M., Kamm B., Witzleben S. & Schulze M. 2018. Lignocellulosic biomass as source for lignin-based environmentally benign antioxidants. *Molecules*. 23: 2364. <https://doi.org/10.3390/molecules23102664>

Angel-Cuapio A. & Loera O. 2016. Uso de residuos agroindustriales como texturizantes para la producción de hongos entomopatógenos en cultivo en estado sólido. *Mexican Journal of Biotechnology*. 1(1): 21-33.

Angellier-Coussy H., Torres-Giner S., Morel M.H., Gontard N. & Gastaldi E. 2008. Functional properties of thermoformed wheat gluten/montmorillonite materials with

respect to formulation and processing conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. 107: 487-496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.065>

Atik C. & Balaban Ucar M. 2003. Relation between CIE lab color values and the lignin content of kraft pulps during bleaching. *Cellulose Chemistry and Technology*, 37: 385-389.

Baumberger S., Lapierre C. & Monties B. 1998. Utilization of pine kraft lignin in starch composites: Impact of structural heterogeneity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2234-2240. <https://doi.org/10.1021/jf971067h>

Bendary E., Francis R. R., Ali H. M. G., Sarwat M. I. & El Hady S. 2013. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*. 58(2): 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2013.07.002>

Bhat R., Abdullah N., Din R. H. & Tay G. S. 2013. Producing novel sago starch-based food packaging films by incorporating lignin isolated from oil palm black liquor waste. *Journal of Food Engineering*. 119: 707-713. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.043>

Chen P., Zhang L. N., Peng S. P. & Liao B., 2006. Effects of nanoscale hydroxypropyl lignin on properties of soy protein plastics. *Journal of Applied Polymer Science*. 101: 334-341. <https://doi.org/10.1002/app.23755>

Coral-Medina J. D., Woiciechowski A. L., Filho A. Z., Bissoqui L., Noseda M. D., Vandenberghe L. P., Zawadzki S. F. & Soccol C. R. 2016. Biological activities and thermal behavior of lignin from oil palm empty fruit bunches as potential source of chemicals of added value. *Industrial Crops and Products*. 94: 630-637. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.046>

de Sousa Nascimento L., da Mata Vieira F. I. D., Horácio V., Marques F. P., Rosa M. F., Souza, S. A., de Freitas R. M., Uchoa D. E. A., Mazzeto S. E. & Lomonaco D. 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/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.156>

Duval A., Molina-Boisseau S., & Chirat C. 2013. Comparison of Kraft lignin and lignosulfonates addition to wheat gluten-based materials: Mechanical and thermal properties. *Industrial Crops and Products*. 49: 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.027>

Espinoza Acosta J. L., Torres Chávez P. I., Ramírez-Wong B., Bello-Pérez L. A., Vega Ríos A., Carvajal Millán E., Plascencia Jatomea M. & Ledesma Osuna A. I. 2015. Mechanical, thermal, and antioxidant properties of composite films prepared from durum wheat starch and lignin. *Starch-Stärke*. 67: 502-511. <https://doi.org/10.1002/star.201500009>

Espinoza-Acosta J. L., Torres-Chávez P. I., Ramírez-Wong, López-Saiz C. M. & Montaña-Leyva B. 2016. Antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic properties of technical lignins and their applications. *BioResources*. 11: 5452–5481. https://doi.org/10.15376/biores.11.2.Espinoza_Acosta

Figueiredo P., Lintinen K., Hirvonen J., Kostianen M. A. & Santos H. A. 2018. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*. 93: 233-269. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.12.001>

García A., Toledano A., Andrés M. A. & Labidi J. 2010. Study of antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochemistry*. 45(6): 935-940. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.02.015>

González-Estrada R. R., Calderón-Santoyo M., Ragazzo-Sánchez J. A., Peyron S., & Chalier P. 2018. Antimicrobial soy protein isolate-based films: physical characterization, active agent retention and antifungal properties against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(4): 921-929. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13664>

Hakimi A. S. A., Mustapha S. N. H. & Mustapha R. 2021. Starch-based film enhancement with lignin, nata de coco and sunflower oil: A mini review. *Journal of Petrochemical Engineering* 1(1): 6-10. <https://doi.org/10.36959/901/248>

Huang J., Zhang L. & Chen P. 2003. Effects of lignin as a filler on properties of soy protein plastics. II. Alkaline lignin. *Journal of Applied Polymer Science*. 88: 3291-3297. <https://doi.org/10.1002/app.12184>

Ishimaru H., Umezawa T., Yoshikawa T., Koyama Y., Fumoto E., Sato S., Nakasaka Y. & Masuda T. 2023. Antifungal activity of simply fractionated organosolv lignin against *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*. 364: 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.01.003>.

Javed A., Rättö P., Järnström L. & Ullsten H. 2021. Lignin-containing coatings for packaging materials—pilot trials. *Polymers*. 13: 1595. <https://doi.org/10.3390/polym13101595>

Jiang B., Chen H., Zhao H., Wu W. & Jin Y. 2020. Structural features and antioxidant behavior of lignins successively extracted from ginkgo shells (*Ginkgo biloba* L). *International Journal of Biological Macromolecules*. 163: 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.027>

Kaewtatip K. & Thongmee J. 2013. Effect of kraft lignin and esterified lignin on the properties of thermoplastic starch. *Materials and Design* 49: 701–704. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2013.02.010>

Kim J. Y., Hwang H., Oh S., Kim Y. S., Kim U. J. & Choi J. W. 2014. Investigation of structural modification and thermal characteristics of lignin after heat treatment.

International Journal of Biological Macromolecules. 66: 57-65.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.013>

Kim T. H, Park S. H., Lee S., Bharadwaj A. V. S. L. S., Lee Y. S., Yoo C. G. & Kim T. H. 2023. A review of biomass-derived uv-shielding materials for bio-composites. *Energies*. 16(5): 2231. <https://doi.org/10.3390/en16052231>

Li J., Henriksson G. & Gellerstedt G. 2007. Lignin depolymerization/ repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresources Technology*. 98: 3061–3068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.018>

Lu Q., Liu W., Yang L., Zu Y., Zu B., Zhu M., Zhang Y., Zhang X., Zhang R., Sun Z., Huang J., Zhang X. & Li W. 2012. Investigation of the effects of different Organosolv pulping methods on antioxidant capacity and extraction efficiency of lignin. *Food Chemistry*. 131: 313-317. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.116>

Marques de Farias P., Barros de Vasconcelos L., da Silva Ferreira M. E., Alves Filho E. G., De Freitas V. A. A. & Tapia-Blácido D. R. 2021. “Nopal cladode as a novel reinforcing and antioxidant agent for starch-based films: A comparison with lignin and propolis extract.” *International Journal of Biological Macromolecules*. 183: 614-626. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.143>

Montaño-Leyva B., Torres-Chávez P., Ramírez-Wong B., Plascencia-Jatomea M., & Brown-Bojórquez F. 2008. Physical and mechanical properties of durum wheat (*Triticum durum*) starch films prepared with A- and B-type granules. *Starch/Stärke*. 60: 559–567. <https://doi.org/10.1002/star.200800227>

Ni S., Bian H., Zhang Y., Fu Y., Liu W., Qin M. & Xiao H. 2022. Starch-based composite films with enhanced hydrophobicity, thermal stability, and UV-shielding efficacy induced by lignin nanoparticles. *Biomacromolecules*. 23(3): 829–838. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01288>

Nunez-Flores R., Gimenez B., Fernandez-Martin F., Lopez-Caballero M. E., Montero M. P. & Gomez-Guillen M. C. 2013. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloid*. 30: 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.017>

Pan X., Kadla J., Fehara K., Gilkes N. & Saddler J. N. 2006. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 5806-5813. <https://doi.org/10.1021/jf0605392>

Prasetyo I., Permatasari P. R., Laksmana W. T., Rochmadi R., Oh W.-C. & Ariyanto T. 2020. Lignin refinery using organosolv process for nanoporous carbon synthesis. *Molecules*. 25 (15): 3428. <https://doi.org/10.3390/molecules25153428>

Sun X., Li Q., Wu H., Zhou Z., Feng S., Deng P., Zou H., Tian D. & Lu C. 2023. Sustainable starch/lignin nanoparticle composites biofilms for food packaging applications. *Polymers*. 15: 1959. <https://doi.org/10.3390/polym15081959>

Vansteelandt J. & Delcour J. A. 1999. Characterization of starch from durum wheat (*Triticum durum*). *Starch/Stärke*. 51:73–80. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-379X\(199903\)51:2<73::AID-STAR73>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-379X(199903)51:2<73::AID-STAR73>3.0.CO;2-8)

Vargas-Torrico M. F., von Borries-Medrano E., Valle-Guadarrama S. & Aguilar-Méndez, M. A. 2022. Physicochemical and antifungal properties of active gelatin-carboxymethylcellulose films with coconut shell extract. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 14: 33-50. <http://dx.doi.org/10.5154/r.inagbi.2021.09.110>

Vega-López G. A., Gómez-Hernández E., Hernández-Domínguez E. M., Mendoza-Mendoza, B., Romero-López M. R. & Vargas-Torres A. 2016. Elaboración de espumas solidas a partir de almidón y fibra de maguey (*Agave spp*) como alternativa al uso del poliestireno. *Mexican Journal of Biotechnology*. 1(1): 88-92

Wang J., Deng Y., Qian Y., Qiu X., Ren Y. & Yang, D. 2016. "Reduction of lignin color via one-step UV irradiation." *Green Chemistry*. 18(3): 695-699. <https://doi.org/10.1039/c5gc02180d>

Xu F., Sun J. X., Sun R. C., Fowler P. & Baird M. S. 2006. Comparative study of Organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products*. 23: 180-193. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.05.008>

Yang W., Puglia D. & Kenny J. M. 2015. Structure and properties of biodegradable wheat gluten bionanocomposites containing lignin nanoparticles. *Industrial Crops and Products*. 74: 348-356. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.032>

Yun J., Wei L., Li W., Gong D., Qin H., Feng X., Li G., Ling Z., Wang P. & Yin B. 2021. Isolating high antimicrobial ability lignin from bamboo kraft lignin by Organosolv fractionation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9: 683796. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.683796>

Zhang H., Fu S. & Chen Y., 2020. Basic understanding of the color distinction of lignin and the proper selection of lignin in color-depended utilizations. *International Journal of Biological Macromolecules*. 147: 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.105>