



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Elaboración de películas antimicrobianas a partir de recursos sub-utilizados:  
quitosano de conchas de camarón (*Penaeus vannamei*) y almidón de ocumo  
chino (*Colocasia esculenta*).**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Any Aury Quintero Contreras como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor (a): Dra. Rosa Raybaudi-Massilia

CARACAS, VENEZUELA  
OCTUBRE-2010

A Dios, mis padres *Genryy y Ana*, mi hermana *Ingrid*,  
mi novio *Kenry*, a todos los que creyeron en mí y a  
quienes me enseñaron a encarar las  
adversidades sin perder nunca  
la dignidad ni desfallecer  
en el intento.

*“Estoy absolutamente convencido de que la ciencia y la paz triunfan sobre la ignorancia y la guerra, que las naciones se unirán a la larga no para destruir sino para edificar, y que el futuro pertenece a aquellos que han hecho mucho por el bien de la humanidad”.*

*Louis Pasteur.*

## AGRADECIMIENTOS

*Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mi, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.*

Primero y antes que nada, dar gracias a **DIOS**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda mi vida.

Me gustaría agradecer a mi tutor de Tesis, **DRA. ROSA RAYBAUDI-MASSILIA**, quien con su esfuerzo, dedicación, conocimientos, orientaciones, manera de trabajar, persistencia, paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador.

A mis jurados, Dra. **MARIA S. TAPIA**, Msc. **ANNALISSE BERTSCH**, Dra. **MARINELA BARRERO** y a muchos profesores que han inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa como investigador, en especial me gustaría destacar a la Dra. **GUILLERMINA ALONSO**, Dra. **ELEVINA PÉREZ**, Dra. **MERIS CASSOTO**, MSc. **ZURIMA GONZÁLEZ**. Gracias por permitirme preguntar hasta el infinito y discutir hasta la saciedad.

A mi familia, en especial a mis padres **GENRRY QUINTERO** y **ANA CONTRERAS** y a mi hermana **INGRID QUINTERO**, quienes me han brindado un hogar cálido y me enseñaron que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos, forjando en mi todo lo que soy como persona, mis valores, principios y empeño, con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Se que no existirá forma alguna de agradecer una vida de sacrificios, esfuerzos y amor, quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudó a conseguirlos fue su gran apoyo.

A mi novio **HENRY CEREZO**, por su paciencia, comprensión, empeño, fuerza, amor, por ser tal y como es, porque lo quiero. Es la persona que más directamente ha sufrido las consecuencias del trabajo realizado y a pesar de ello me ayuda a conseguir un equilibrio que me permite dar el máximo de mí.

A mis amigos, sin excluir a ninguno, por estar conmigo en las buenas y en las malas, alegrías y tristezas y en el relajo!!!. En especial A **AURELIO GOMES** quien también sufrió las consecuencias de esta tesis y quien logró que este largo camino fuera más fácil con su compañía, experiencias y palabras de aliento, gracias por aguantarme y por estar siempre dispuesto a ayudarme, “Obrigado por tudo”. A **JESÚS RAMÍREZ** (no tiene remedio) que a pesar de llegar tarde a todas mis presentaciones, encuentros o de no llegar! siempre cuento con él. A **ELEA MEDINA** quien me acompañó desde los inicios de mi carrera y con quien compartí tantas materias, experiencias y desveladas. A **INGRID SMITH** sabes que estás bien loca y no tienes cura, gracias por acompañarme en los últimos años de mi carrera. Ha sido un camino largo y duro en el que, algunas veces, la fijación por lograr tus objetivos te hace olvidar la importancia del contacto humano, sin embargo nunca lo perdimos.

A quienes fueron compañeros de laboratorio y lograron crear un ambiente agradable, **MIGUEL, M° ISABEL, LORIAN, DANIELA, MILAGROS, ELISABETH, YOLIMA, PATRIZIA**, y muchos más pero en especial a **SABRINA ORTIZ** ya que sin su ayuda el camino hubiese sido más intrincado. Y a **HAZEL** (técnico del laboratorio de procesos Biotecnológicos del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía - UCV) por contribuir con el desarrollo de este proyecto.

Por mucho que me haya quejado en estos años y que me queje en lo que me queda, tengo que agradecer a la ciencia la oportunidad de ver mundo y el flujo constante de amigos que me proporciona. Me ha regalado con el encuentro de algunas de las personas, y una muy, muy en particular, más importantes de mi vida.

## RESUMEN

Actualmente los materiales de empaque que utilizan la mayoría de las industrias de alimentos no son amigables con el ambiente lo que trae como consecuencia que su degradación demore años, esto ha hecho que surjan investigaciones para desarrollar materiales de empaque que sean biodegradables y que ofrezcan otros beneficios como que sean activos, es decir que sirvan de transporte de agentes antimicrobianos, para garantizar productos inocuos para el consumidor sin ocasionar impactos negativos al ambiente. En el presente estudio se elaboraron películas comestibles con propiedades antimicrobianas a partir de quitosano y almidón extraídos de materiales subutilizados como conchas de camarones (*Penaeus vannamei*) y ocumo chino (*Colocasia esculenta*), evaluando además sus propiedades de barrera, estructurales, mecánicas y funcionales. Para ello se procedió a realizar la extracción y caracterización de la materia prima; los resultados demostraron que los métodos empleados para la extracción de los polímeros son eficientes obteniéndose almidón con 99,14% de pureza y quitosano con un grado de desacetilación del 72,45%. Por otra parte la aplicación de un diseño factorial de múltiples niveles permitió encontrar las formulaciones óptimas para películas a base de almidón o quitosano conteniendo aceites esenciales de orégano y ajo como sustancias antimicrobianas contra microorganismos patógenos como *Salmonella entérica* Ser. Enteritidis y *Listeria monocytogenes*, encontrándose que 7% de almidón, 2% de glicerol y 0,5% de aceite esencial de orégano y 0,25% aceite esencial de ajo fue la combinación ideal para películas de almidón, mientras que 4,485% de quitosano, 2% de glicerol y 0,82% de aceite esencial de orégano y 0,5% aceite esencial de ajo fue la combinación ideal para películas de quitosano. Además, los resultados demostraron que la concentración de polímero (almidón o quitosano) y aceites esenciales utilizada afecta significativamente ( $p < 0,05$ ) las propiedades de barrera, estructurales, mecánicas y funcionales de las películas. En conclusión, el desarrollo de películas antimicrobianas a partir de productos subutilizados como las conchas de camarones y ocumo chino es totalmente factible y representa una alternativa novedosa para aprovechar estos materiales, ofreciendo a la industria de alimentos materiales biodegradables para empaques que garantizarían la calidad e inocuidad de los alimentos.

## ÍNDICE

<b>Dedicatoria</b> .....	2
<b>Agradecimientos</b> .....	4
<b>Resumen</b> .....	6
<b>Índice</b> .....	7
<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	11
<b>Introducción</b> .....	17
<b>Antecedentes</b> .....	19
1. Definición de las películas.....	19
2. Materiales base utilizados para la elaboración de las películas.....	19
2.1 Películas a base de lípidos.....	20
2.2 Películas a base de hidrocolóides.....	21
2.2.1. Proteínas.....	21
2.2.2. Polisacárido.....	21
✓ Almidón.....	22
✓ Quitosano.....	27
2.3 Películas compuestas.....	36
3. Películas antimicrobianas.....	36
Aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	39
Aceite esencial de ajo ( <i>Allium sativum</i> ).....	39
4. Uso de las películas comestibles en la industria de alimentos.....	40
Sistema de mantenimiento de anaerobiosis.....	40

Absorción en agua.....	41
Sistemas con migración de antimicrobianos.....	41
<b>Objetivos.....</b>	<b>45</b>
Objetivo General.....	45
Objetivos Específicos.....	45
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>46</b>
<b>Fase 1. Extracción de quitosano y almidón a partir de productos naturales subutilizados para su aprovechamiento como base en la formulación de películas.....</b>	<b>46</b>
1.1 Extracción de almidón de tubérculos de ocumo chino <i>Colocasia esculenta</i> .....	46
✓ Humedad.....	46
✓ Rendimiento.....	47
✓ Pureza.....	47
1.2 Extracción de quitosano a partir de la concha del crustáceo <i>Penaeus vannamei</i> .....	48
✓ Humedad.....	48
✓ Rendimiento.....	49
✓ Grado de desacetilación.....	49
<b>Fase 2. Determinación de la formulación base de las películas comestibles.....</b>	<b>52</b>
2.1 Determinación de la formulación ideal a base de almidón de ocumo chino.....	52
2.2 Determinación de la formulación ideal a base de quitosano.....	52
<b>Fase 3. Formulación de películas.....</b>	<b>53</b>

3.1 Formulación de las películas antimicrobianas a base de almidón de ocumo chino ( <i>Colocasia esculenta</i> ).....	53
3.2 Formulación de las películas antimicrobianas a base de quitosano.....	54
<b>Fase 4.</b> Propiedades de las películas antimicrobianas comestibles.....	57
4.1 Propiedad de barrera: Permeabilidad al vapor de agua.....	57
4.2 Propiedad estructural: Solubilidad en agua.....	58
4.3 Propiedad mecánica: Resistencia a la tensión de elongación.....	58
4.4 Propiedad funcional: actividad antimicrobiana.....	59
<b>Fase 5.</b> Análisis estadístico de los resultados.....	61
<b>Resultados</b> .....	62
<b>Fase 1.</b> Caracterización de los compuestos extraídos a partir de productos naturales subutilizados (quitosano y almidón) empleados como base en la formulación de películas antimicrobianas.....	62
1.1 Almidón.....	62
1.2 Quitosano.....	66
<b>Fase 2.</b> Estudios preliminares para determinar la formulación base de las películas comestibles.....	68
2.1 Formulaciones ideales a base de almidón de ocumo chino y quitosano.....	68
<b>Fase 3.</b> Formulación de las películas antimicrobianas comestibles.....	71

3.1 <b>Almidón.</b> Formulación de las películas a base de almidón de ocumo chino ( <i>Colocasia esculenta</i> ) mediante la aplicación de un diseño factorial de múltiples niveles.....	71
3.2 <b>Quitosano.</b> Formulación de las películas a base de quitosano mediante la aplicación de un diseño factorial de múltiples niveles.....	71
<b>Fase 4.</b> Propiedades de las películas antimicrobianas comestibles.....	72
4.1 <b>Propiedad de barrera:</b> Permeabilidad al vapor de agua.....	72
4.2 <b>Propiedad estructural:</b> Solubilidad en agua.....	80
4.3 <b>Propiedad mecánica:</b> Fuerza a la punción.....	87
4.4 <b>Propiedad funcional:</b> Actividad antimicrobiana.....	94
<b>Fase 5.</b> Aplicación del diseño experimental para determinar la formulación ideal.....	106
<b>Conclusiones</b> .....	107
<b>Recomendaciones</b> .....	109
<b>Bibliografía</b> .....	110
<b>Anexos</b> .....	117

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Compuestos principalmente usados para la elaboración de películas, modificado de Cha y Chinnan (2004).....	20
<b>Figura 2.</b> Distribución porcentual del sector agrícola en Venezuela durante los años 1970, 1989, 1990 y 1991. Fuente: Anuario Estadístico Agropecuario (AEA) 1989-90-91 y 1970.....	25
<b>Tabla 1.</b> Distribución porcentual de la producción del sector de los vegetales para los años 1970, 1989, 1990 y 1991.....	26
<b>Tabla 2.</b> Producción en toneladas de las variedades de raíces y tubérculos producidos en Venezuela en 1990.....	26
<b>Tabla 3.</b> Superficie, producción y Rendimiento 1945-1991 del ocumo.....	27
<b>Figura 3.</b> Esquema general para el aprovechamiento de conchas de crustáceos en el desarrollo de nuevos productos. Fuente: Velázquez, 2006.....	29
<b>Figura 4.</b> Producción acuícola global de <i>Penaeus vannamei</i> en América Latina. Fuente: (FAO, 2006a)...	34
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción de aceites esenciales y sus componentes en la célula. La figura ilustra los posibles modos de acción de los diferentes aceites esenciales. Fuente: Raybaudi y col. 2009.....	38
<b>Tabla 4.</b> Aplicación de los biopolímeros con antimicrobianos para la protección de alimentos.....	43
<b>Figura 6.</b> Metodología aplicada para la extracción de almidón a partir de ocumo chino ( <i>Colocasia esculenta</i> ), basada en la metodología planteada por Pérez y col., 1993 con ligeras modificaciones.....	50

<b>Figura 7.</b> Metodología aplicada para la extracción de quitosano a partir de conchas de camarón ( <i>Penaeus vannamei</i> ), basada en la metodología reportada por Parada y col. 2006 con ligeras modificaciones.....	51
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de los componentes de las formulaciones de películas a base de almidón de ocumo chino y quitosano probadas.....	53
<b>Figura 8.</b> Metodología aplicada para la formulación de películas antimicrobianas comestibles a base de almidón de ocumo chino ( <i>Colocasia esculenta</i> ). Basado en las metodologías propuesta Romero y col., (2005) y Bertuzzi y col. (2007) con algunas modificaciones.....	55
<b>Figura 9.</b> Formulación de las películas antimicrobianas a base de quitosano, basada en la metodología reportada por Bégin y col., (1999) y Sangsuwan y col., (2008), con ligeras modificaciones.....	56
<b>Figura 10.</b> Montajes experimentales realizados para evaluar diversas propiedades a las películas comestibles formuladas. (a) Permeabilidad al vapor de agua, (b) Solubilidad en agua, (c) Punción, (d) Acción antimicrobiana.....	60
<b>Tabla 6.</b> Caracterización del almidón aislado de tubérculos de ocumo chino ( <i>C. esculenta</i> ).....	64
<b>Figura 11.</b> Micrografía de almidones aislados de tubérculos de <i>Colocasia esculenta</i> obtenidas por descripción al microscopio óptico (100 X 10).....	65
<b>Figura 12.</b> Curva de titulación para el quitosano obtenido a partir de conchas de <i>Penaeus vannamei</i> . En el recuadro superior se muestra la primera derivada, donde los máximos corresponden a los puntos de inflexión.....	67

<b>Tabla 7.</b> Composición del quitosano extraído de conchas de <i>Penaeus vannamei</i> y del quitosano comercial.....	67
<b>Figura 13.</b> Tratamiento de una solución de noni al 2% en carbón activado. (a) Diferencias en la coloración de la solución de noni y (b) acción antimicrobiana contra <i>Salmonella entérica</i> Ser. Enteritidis antes y después del tratamiento.....	70
<b>Tabla 8.</b> Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino al 6%, 7% y 8%, incorporando aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% y 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 0,5% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).....	76
<b>Tabla 9.</b> Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas comestibles elaboradas a base de quitosano al 3,5%, 4% y 4,5%, incorporando aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% y 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 0,5% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).....	77
<b>Figura 14.</b> Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino al 6%, 7% y 8% y quitosano (3,5%, 4% y 4,5%), incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0%, 0,5% y 1%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).....	78
<b>Figura 15.</b> Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino al 6%, 7% y 8% y quitosano (3,5%, 4% y 4,5%), incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).....	79
<b>Tabla 10.</b> Solubilidad en agua a temperatura ambiente (T=25°C) de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO)	

al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).....	83
<b>Tabla 11.</b> Solubilidad en agua a temperatura ambiente (T=25°C) de películas formuladas a base de quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).....	84
<b>Figura 16.</b> Solubilidad en agua a temperatura ambiente (T=25°C) de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino o quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0%, 0,5% y 1%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).....	85
<b>Figura 17.</b> Solubilidad en agua a temperatura ambiente (T=25°C) de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino o quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).	86
<b>Tabla 12.</b> Fuerza a la punción de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).....	90
<b>Tabla 13.</b> Fuerza a la punción de películas formuladas a base de quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).....	91

<b>Figura 18.</b> Fuerza a la punción de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino y quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).....	92
<b>Figura 19.</b> Fuerza a la punción de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino y quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).....	93
<b>Tabla 14.</b> Actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino, incorporando aceite esencial de orégano (AEO), aceite esencial de ajo (AEA) y combinaciones de aceites esenciales (AEO+AEA) contra <i>Salmonella entérica</i> Ser. Enteritidis y <i>Listeria monocytogenes</i> .....	95
<b>Tabla 15.</b> Actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas a base de quitosano, incorporando aceite esencial de orégano (AEO), aceite esencial de ajo (AEA) y combinaciones de aceites esenciales (AEO+AEA) contra <i>Salmonella entérica</i> Ser. Enteritidis y <i>Listeria monocytogenes</i> .....	96
<b>Figura 20.</b> Fotografías de discos de películas antimicrobianas comestibles a base de almidón de ocumo chino (a y c) y quitosano (b y d) sobre placas de agar inoculadas con <i>S. entérica</i> (a y b) y <i>L. monocytogenes</i> (c y d).....	97
<b>Figura 21.</b> Fotografías de discos de películas antimicrobianas comestibles a base de almidón de ocumo chino sin aceites esenciales (a), con 0,25% de aceite esencial de ajo (b), con 0,5% de aceite esencial de ajo (c) y 1% de aceite de orégano + 0,25% de aceite de ajo (c) sobre placas de agar inoculadas con <i>S. entérica</i> .....	101
<b>Figura 22.</b> Fotografías de discos de películas antimicrobianas comestibles a base de quitosano al 3,5% con 0,5% aceite de orégano (a), 0,5% aceite de orégano + 0,25% de aceite esencial de ajo (b) y 1% de aceite de orégano (c) sobre placas de agar inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> .....	102

**Figura 23.** Estructura molecular, nombre sistémico (IUPAC) y fórmula química de los componentes antimicrobianos principales aceites esenciales (a) carvacrol y (b) alicina. Tomado de: [www.aromaticplantproject.com/images/carvacrol](http://www.aromaticplantproject.com/images/carvacrol) y [http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos\\_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm](http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm)..... 105

## INTRODUCCIÓN

Los cambios en los hábitos alimenticios de los consumidores junto con una activa promoción de consumo de alimentos con bajo contenido calórico, mínimo procesamiento y con la menor cantidad de aditivos añadidos ha incrementado el riesgo del consumidor de sufrir enfermedades transmitidas por alimentos, así el número de brotes ha aumentado en los últimos años (Tapia y col. 2007). En tal sentido, un creciente interés en suministrarle al consumidor el tipo de productos que demanda, pero garantizando su calidad e inocuidad empleando diferentes tipos de empaques ha ocurrido. En busca de solucionar esta problemática, los investigadores se han dedicado a desarrollar coberturas y películas que protejan al alimento del entorno, previniendo de esta manera su contaminación y deterioro y extendiendo por lo tanto su vida útil.

Las películas comestibles mejoran la calidad de los alimentos debido a que sirven como barreras selectivas para la transferencia de humedad, absorción de oxígeno, oxidación lipídica y evitan la pérdida de los compuestos responsables del olor en los alimentos (Pranoto y col., 2005). Las películas comestibles pueden además servir de transporte para un amplio rango de aditivos, vitaminas, aminoácidos, probióticos, antimicrobianos o cualquier otra sustancia de valor nutritivo o que ayude a la conservación del alimento (Tapia y col., 2007 y Coma, 2008). Lo ideal sería que los compuestos empleados para la formulación de las películas que funcionarán como protectoras o empaques fueran biodegradables (materiales naturales de origen animal o vegetal), esto con el fin de evitar ocasionar un impacto negativo significativo en el ambiente, sin embargo no siempre es así.

Diferentes materiales de origen lipídico, proteico y polisacárido, así como también combinaciones de ellos han sido propuestos para la elaboración de películas, sin embargo estos

materiales han sido en gran parte adquiridos comercialmente. Representaría un mayor interés lograr obtenerlos a partir de materiales que normalmente son desechos en las industrias de alimentos, como por ejemplo las conchas de camarones o a partir de productos naturales subutilizados en nuestro país como el ocumo chino.

Las películas elaboradas de materiales naturales pueden inhibir o limitar el crecimiento microbiano, ya sea por el hecho de que limitan parcialmente el paso de oxígeno al producto o porque el material base de por sí tiene propiedades antimicrobianas, como han señalado algunos autores en el caso del quitosano (Rinaudo, 2006). Además se puede lograr impartir propiedades antimicrobianas o aumentar las que ya tiene la película con la incorporación de otras sustancias naturales como los aceites esenciales (orégano y ajo) y otros productos de origen vegetal, animal u obtenido a partir de microorganismos.

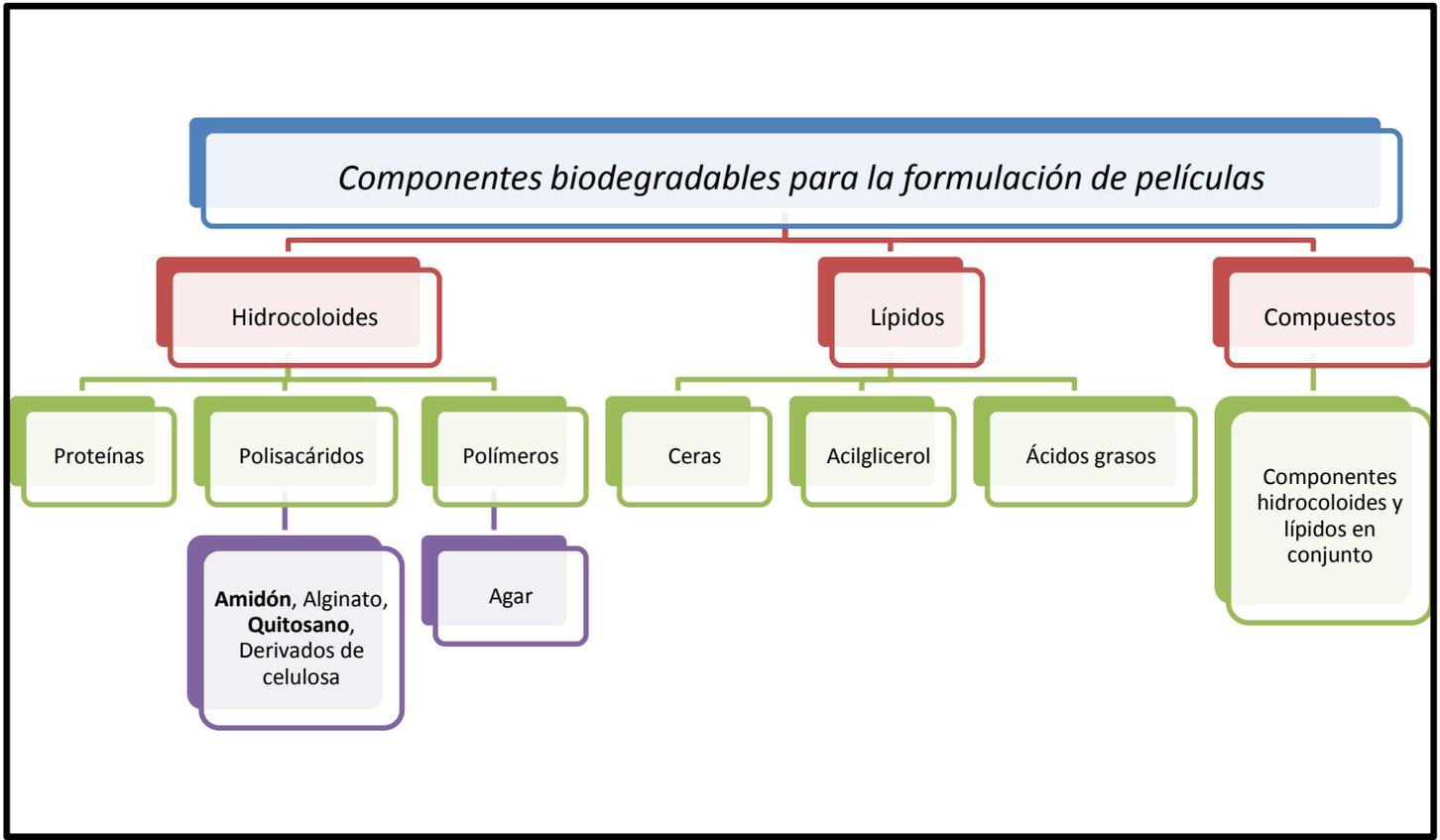
## ANTECEDENTES

### **1. Definición de películas.**

Existen diversos tipos de empaques que tienen como propósito la conservación de las propiedades que caracterizan al alimento. A pesar de que se les conozca con diversos nombres como películas, recubrimientos o coberturas, empaques inteligentes o empaques activos, su función principal sigue siendo la preservación del alimento. Aún cuando para la elaboración de una cobertura o película se puede partir de una misma solución, existe una diferencia fundamental entre ellas, que es su estado físico, es decir una película comestible es definida como una matriz sólida continua que puede ser preparada a partir de proteínas, polisacáridos, o lípidos que se usa para envolver a los alimentos, mientras que una cobertura es aplicada en forma líquida para recubrir el alimento y generalmente se hace por inmersión o rociado (Coma, 2008).

### **2. Materiales base utilizados para la elaboración de las películas.**

Según Cha y Chinnan (2004), los componentes biodegradables de las películas pueden ser clasificados dentro de tres categorías: hidrocoloides, lipídicos y compuestos (Figura 1).



**Figura 1.** Compuestos principalmente usados para la elaboración de películas, modificado de Cha y Chinnan (2004).

### **2.1 Películas a base de Lípidos.**

Las películas comestibles a base de lípidos se caracterizan por ofrecer buenas propiedades de barrera para la permeabilidad al vapor de agua “transporte de humedad”; sin embargo sus propiedades funcionales se pueden ver influenciadas por las características de los lípidos utilizados tales como: estructura, grado de saturación, estado físico, longitud de la cadena y forma (Coma, 2008). Además

este tipo de películas pueden presentar ciertas desventajas como son el impartir un sabor o sensación grasienta, cerosa e incluso rancidez al producto. (Cagri y col., 2004 y Rojas y col., 2006).

## **2.2 Películas a base de hidrocoloídes.**

2.2.1 Proteínas: las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Son adecuadas para realizar recubrimientos en frutas y vegetales, pudiendo derivar de maíz, trigo, soja, nuez, leche o gelatina. Las películas a base de proteínas de manera similar a las películas a base de polisacáridos exhiben altos valores de permeabilidad al vapor de agua debido a la naturaleza hidrofílica de las proteínas y a la cantidad de plastificantes hidrofílicos, así como también a la glicerina y al sorbitol en caso de que sea incorporado en la formulación, los cuales son responsables de la flexibilidad (Cagri y col., 2004). Un problema que puede encontrarse con la elaboración de películas a base de proteínas es la esperada susceptibilidad de las mismas a enzimas proteolíticas presentes en alimentos como carnes, aves de corral y productos marinos (Gennadios y col., 1997).

2.2.2 Polisacáridos. Son compuestos constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque también pueden contener fósforo y nitrógeno. Las películas a base de polisacáridos se caracterizan por ser selectivamente permeables al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y por lo tanto, retardan la respiración y maduración de algunas frutas y vegetales, por limitación del oxígeno disponible (Cha y Chinnan, 2004). Además,

las películas a base de polisacáridos debido a su naturaleza hidrofílica son pobres como barrera de permeabilidad al vapor de agua, lo que permite el movimiento del vapor de agua a través de la película previniendo así la condensación de agua y favoreciendo el deterioro por microorganismos en productos hortícolas (Gennadios y col., 1997). Dentro de los polisacáridos que han sido utilizados para la elaboración de películas se pueden encontrar el almidón y el quitosano, los cuales son de interés en el desarrollo del presente proyecto de investigación.

- ✓ **El almidón** es un compuesto biodegradable y económicamente rentable, de naturaleza hidrofílica. Las películas a base de este polisacárido tienen propiedad de barrera al gas moderada y con propiedades mecánicas menores que las películas a base de polímeros sintéticos.

La amilosa es el componente del almidón responsable de la capacidad de formación de la película, siendo la fracción lineal la responsable de la fuerza relativa que hacen a la película de fácil desprendimiento, en contraste con las elaboradas de amilopeptina, las cuales son quebradizas y discontinuas (Gennadios y col., 1997 y Cha y Chinnan, 2004). El almidón puede extraerse de diferentes tubérculos como yuca, papa, zanahoria, remolacha, apio, ñame, mapuey, ocumo, etc.

**Colocasia esculenta como fuente para la obtención de almidón.**

Uno de los tubérculos producidos en Venezuela es *C. esculenta*, comúnmente conocido como ocumo chino o taro, se caracteriza por no presentar tallos aéreos, tiene hojas grandes proveniente de un tallo subterráneo primario, el mismo que es relativamente vertical y del cual nacen tallos laterales y horizontales comestibles.

Principalmente nace en países tropicales, es rico en carbohidratos aunque el contenido de proteínas es relativamente bajo, sin embargo es el mayor en comparación con otros farináceos. También consta de una alta cantidad de minerales, superada solamente por la yuca.

Este tubérculo es originario del sudeste asiático y considerado por diversos investigadores como el primer cultivo doméstico, puede ser cultivado en suelos cubiertos de agua o húmedos, por tal razón representa una oportunidad para la producción de 12 millones de hectáreas, distribuidas en los estados orientales y llaneros venezolanos, que se inundan gran parte del año (Montaldo y col., 2005).

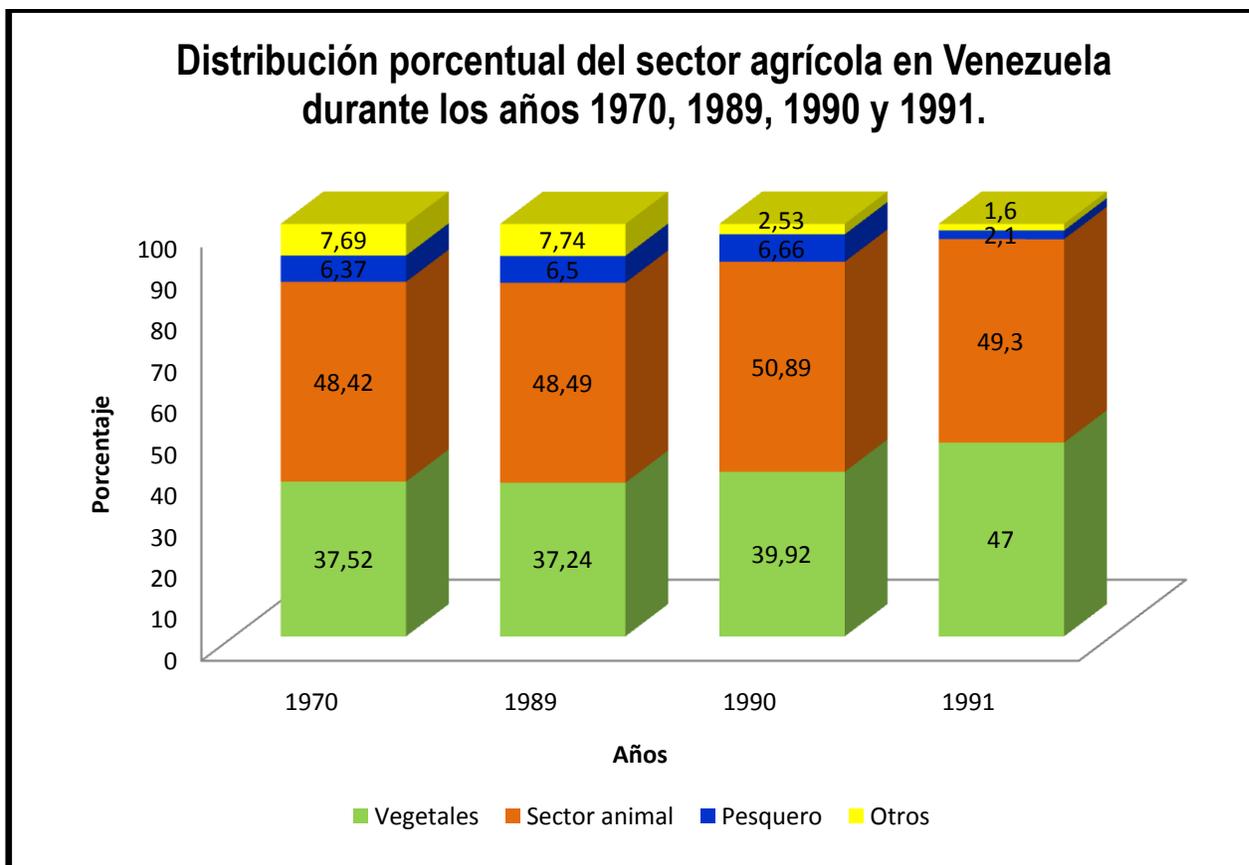
El ocumo constituye una fuente alimentaria de los países de América Latina que se clasifica dentro de las raíces y los tubérculos, que se caracterizan por convertir la mayor cantidad de energía solar en carbohidratos solubles por unidad de área, siendo la producción alrededor del 40% más alta que la del arroz y 25% más alta que la del maíz (Delahaye y col., 2006) además es una fuente alternativa de obtener almidón con buenas propiedades nutricionales.

Producción de **Colocasia esculenta** en Venezuela.

En Venezuela, el mayor porcentaje de las actividades agrícolas para los años 1.970 a 1.991 se encontraban enfocadas en el sector animal siendo del 47% en 1.991, seguido por los vegetales 49,3%, sector pesquero 2,1% y otros 1,6% tal y como se puede apreciar en la figura 2. (Anuario estadístico agropecuario (AEA), 1991).

En la tabla 1 se observa que dentro de la clasificación de los vegetales se tiene que las raíces y tubérculos representan el 13,38%, que junto a los cereales (20%) se emplean como materia prima para la extracción de almidón; esto representa un porcentaje que hace rentable la producción del mismo. Además dentro de las raíces y tubérculos que presentan mayor producción en Venezuela se encuentran yuca, papa seguido del ocumo, ñame y apio, tal y como se muestra en la tabla 2 (AEA, 1991).

La producción de ocumo en Venezuela desde 1.945 a 1.991 se muestra en la tabla 3, siendo la producción en 1.950 de 33.933 T duplicando su valor en el siguiente quinquenio, comportamiento que se mantiene hasta 1.970 (AEA, 1991). En estos años la Venezuela agropecuaria desarrollaba programas y promulgaba leyes (Ley de Reforma Agraria de 1.960), que junto con los avances para la época tales como la incorporación masiva de maquinaria, uso de fertilizantes, insecticidas y herbicidas, empleo de semillas mejoradas, incentivaban la producción agrícola trayendo como consecuencia que el Producto Territorial Bruto (PTB) creciera en un promedio anual de 6% (AEA, 1991).



**Figura 2.** Distribución porcentual del sector agrícola en Venezuela durante los años 1970, 1989, 1990 y 1991. Fuente: Anuario Estadístico Agropecuario (AEA) 1989-90-91 y 1970.

**Tabla 1.** Distribución porcentual de la producción del sector de los vegetales para los años 1970, 1989, 1990 y 1991.

<b>Producto</b>	<b>1970</b>	<b>1989</b>	<b>1990</b>	<b>1991</b>
<u>Vegetales</u>	100	100	100	100
Cereales	29,37	29,2	32,85	19,96
Granos leguminosas	1,44	1,66	1,53	3,13
Textiles y oleaginosas	8,32	7,71	6,09	11,78
Raíces y tubérculos	9,72	9,13	9,54	13,38
Frutas	21,22	22,18	21,69	22,45
Hortalizas	9,06	9,26	9,34	5,37
Café, cacao, caña de azúcar y tabaco	20,87	20,86	18,96	23,94

Fuente: Anuario Estadístico Agropecuario (AEA) 1989-90-91 y 1970.

**Tabla 2.** Producción en toneladas de las variedades de raíces y tubérculos producidos en Venezuela en 1990.

<b>Raíces y tubérculos</b>	<b>Producción (t)</b>
Apio	20267
Batata	6930
Mapuey	1811
Ñame	39569
Ocumo	55076
Papa	200449
Yuca	301647

Fuente: Anuario Estadístico Agropecuario (AEA) 1989-90-91 y 1970.

**Tabla 3.** Superficie, producción y Rendimiento 1945-1991 del ocumo.

Años	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (k/ha)
1945	...	35084	...
1950	9828	33933	3454
1960	14954	69409	4642
1970	11235	70580	6282
1980	6788	39453	5812
1990	9327	55076	5905
1991	9235	57238	6198

Fuente: Anuario Estadístico Agropecuario (AEA) 1989-90-91 y 1970.

- ✓ **El quitosano** es un derivado de la quitina, el cual es el segundo polisacárido más abundante en la tierra después de la celulosa y está disponible en productos desechados de la industria pesquera (Xu y col., 2005 y Al-Sagheer y col., 2009). El quitosano es uno de los pocos polisacáridos catiónicos naturales que puede extraerse del exoesqueleto de diversos crustáceos o de varios hongos del orden *Mucorales*.

La producción industrial del quitosano se considera una alternativa rentable no contaminante para la protección de productos alimenticios ya que se basa en el tratamiento de la concha de diversos tipos de crustáceos (Mármol y col., 2006), las cuales se consideran desechos de las plantas procesadoras de alimentos. La obtención del quitosano se realiza a partir de quitina, la cual sufre un proceso de desacetilación química o enzimática (Rianudo, 2006). La quitina y el quitosano extraído de

conchas de crustáceos pueden ser aprovechados de diferentes maneras en la industria de alimentos, tal como se muestra en la Figura 3.

#### Aplicaciones del quitosano.

Muchas son las aplicaciones que se encuentran asociadas al uso de quitosano. En la agricultura se puede usar para realizar recubrimiento en semillas para su conservación durante el almacenamiento, como agentes bactericidas para protección de plantas y como sistemas liberadores de fertilizantes; en medicina se producen cremas bactericidas para tratamiento de quemaduras y para la producción de suturas, gasas y vendajes.

También puede ser empleado para el tratamiento de aguas, ya que los derivados de la quitina pueden actuar como coagulante primario para aguas residuales de altas turbidez y alta alcalinidad, floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas, aceites de pescado, captura los metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas.

En el campo de la cosmética, de estos compuestos se fabrican cápsulas para adelgazar “atrapa grasas”, aditivos bactericidas en jabones, shampoo, etc. y también es empleado como agente hidratante para la piel (Velásquez, 2006). En tecnología de alimentos, el quitosano ha sido usado para el revestimiento de alimentos debido a su propiedad formadora de películas, manteniendo la calidad postcosecha de productos como frutas y vegetales (Chien y col, 2007), siendo una alternativa que no causa impactos negativos en el ambiente por ser biodegradable.

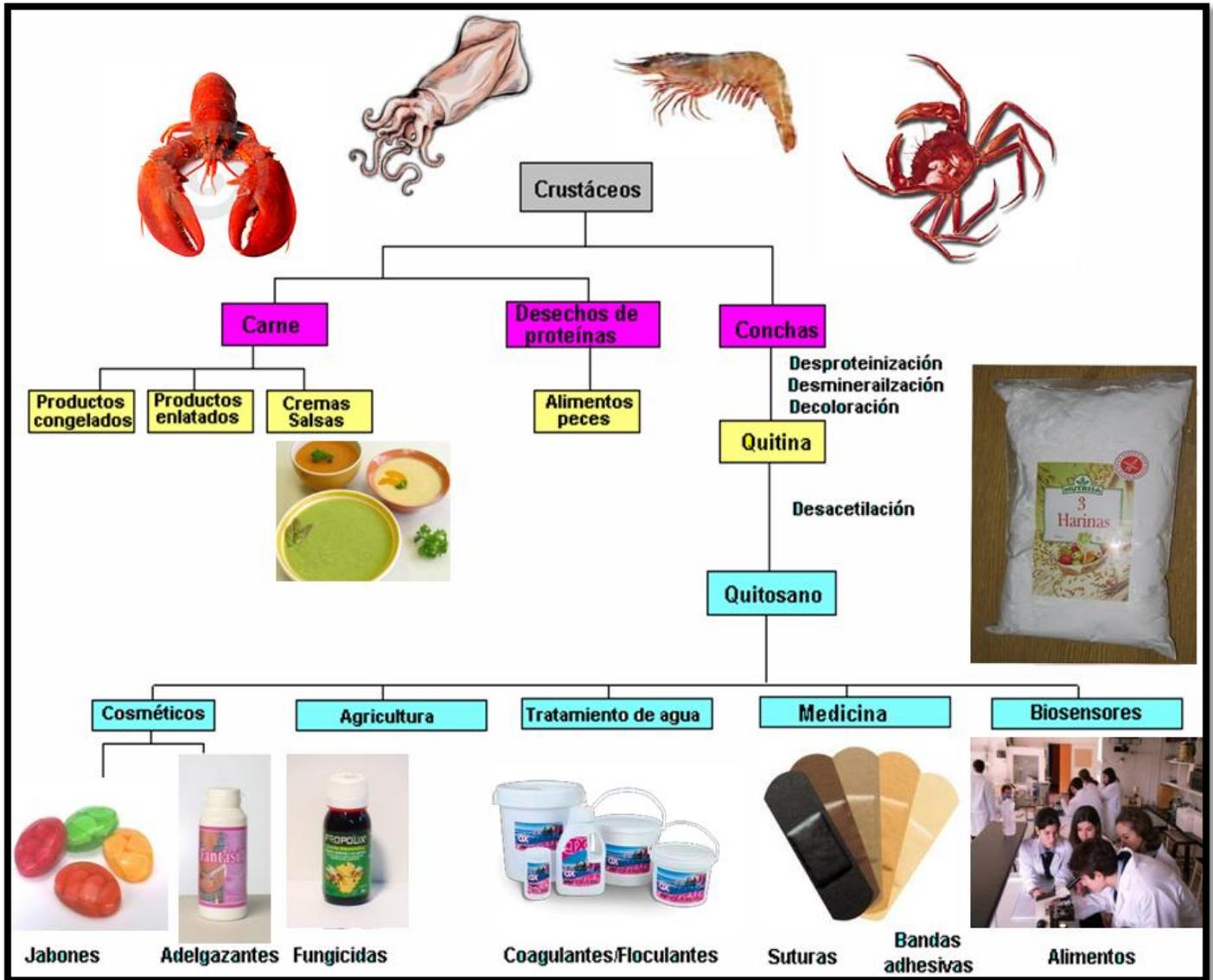


Figura 3. Esquema general para el aprovechamiento de conchas de crustáceos en el desarrollo de nuevos productos. Fuente: Velázquez, 2006.

### El quitosano como antimicrobiano.

El carácter catiónico del quitosano es único: es el único polímero catiónico pseudo-natural que posee una actividad antimicrobiana peculiar. Tres mecanismos han sido propuestos como explicaciones de la actividad antimicrobiana del quitosano; el primero de ellos se basa en que las cargas positivas presentes en las cadenas poliméricas del quitosano (debido a sus grupos aminos), interaccionan con las cargas negativas de las moléculas residuales (lipopolisacáridos y proteínas) de la membrana de las bacterias, interfiriendo con el intercambio de nutrientes entre el interior y el exterior celular. Estas cargas pueden también competir con el calcio por los sitios electronegativos en la membrana, comprometiendo su integridad y causando la liberación del material intracelular y por ende la muerte del microorganismo (Rinaudo, 2006; Martínez y col., 2010).

El segundo mecanismo propone que el quitosano actúa como agente quelante, el cual forma complejos con trazas de metales esenciales para la célula bacteriana. Mientras que el tercer mecanismo establece que el quitosano de bajo peso molecular es capaz de entrar al núcleo de la célula, por lo que puede interactuar con el DNA, interfiriendo con la síntesis de RNA mensajero, afectando la síntesis de proteínas e inhibiendo la acción de varias enzimas (Martínez y col., 2010).

Los mecanismos anteriormente descritos, se encuentran basados en resultados de previas investigaciones donde el quitosano fue agregado en medios de cultivo tanto líquido como sólidos, sin embargo en el caso de las películas el mecanismo de inhibición no ha sido explicado debido a que existen otros factores externos como las condiciones anaerobias que tienen que ser consideradas (Martínez y col., 2010).

***Penaeus vannamei* como fuente de obtención de quitosano.**

*P. vannamei* es uno de los ejemplares que suele usarse en la extracción de quitosano. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 2006, estos ejemplares se caracterizan por presentar Rostrum moderadamente largo con 7–10 dientes dorsales y 2–4 dientes ventrales.

En los machos maduros petasma simétrico y semi abierto; espermátóforos complejos, consistentes de masa espermática encapsulada por la vaina. Las hembras maduras tienen el tético abierto, seis nauplios, tres proto-zoeas, y tres etapas de mysis; su coloración es normalmente blanca translúcida, pero puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua. La talla máxima 23 cm. Comúnmente las hembras crecen más rápidamente y adquieren mayor talla que los machos (FAO, 2006a).

***Producción de P. vannamei.***

La primera reproducción artificial de esta especie se logró en Florida en 1.973 a partir de nauplios procedentes de una hembra ovada silvestre capturada en Panamá. Tras los resultados positivos obtenidos en estanques y el descubrimiento de la ablación unilateral (y nutrición adecuada) para promover la maduración en Panamá en 1.976, el cultivo comercial de *P. vannamei* se inició en Centro y Sudamérica.

Desde este momento, el cultivo comercial de esta especie en América Latina mostró una tendencia de rápido crecimiento (con picos cada 3 ó 4 años, en los años cálidos y húmedos de presencia de “El Niño”), y declives coincidentes con la irrupción de enfermedades durante los años fríos de presencia de “La Niña”. A pesar de estos problemas, la producción de *P. vannamei* en el continente americano ha continuado incrementándose. Después de su declive en 1.998 en que se alcanzó un volumen pico de 193.000 toneladas, descendiendo a 143.000 toneladas en 2000, la producción volvió a aumentar a 270.000 toneladas en 2004 (FAO, 2006a).

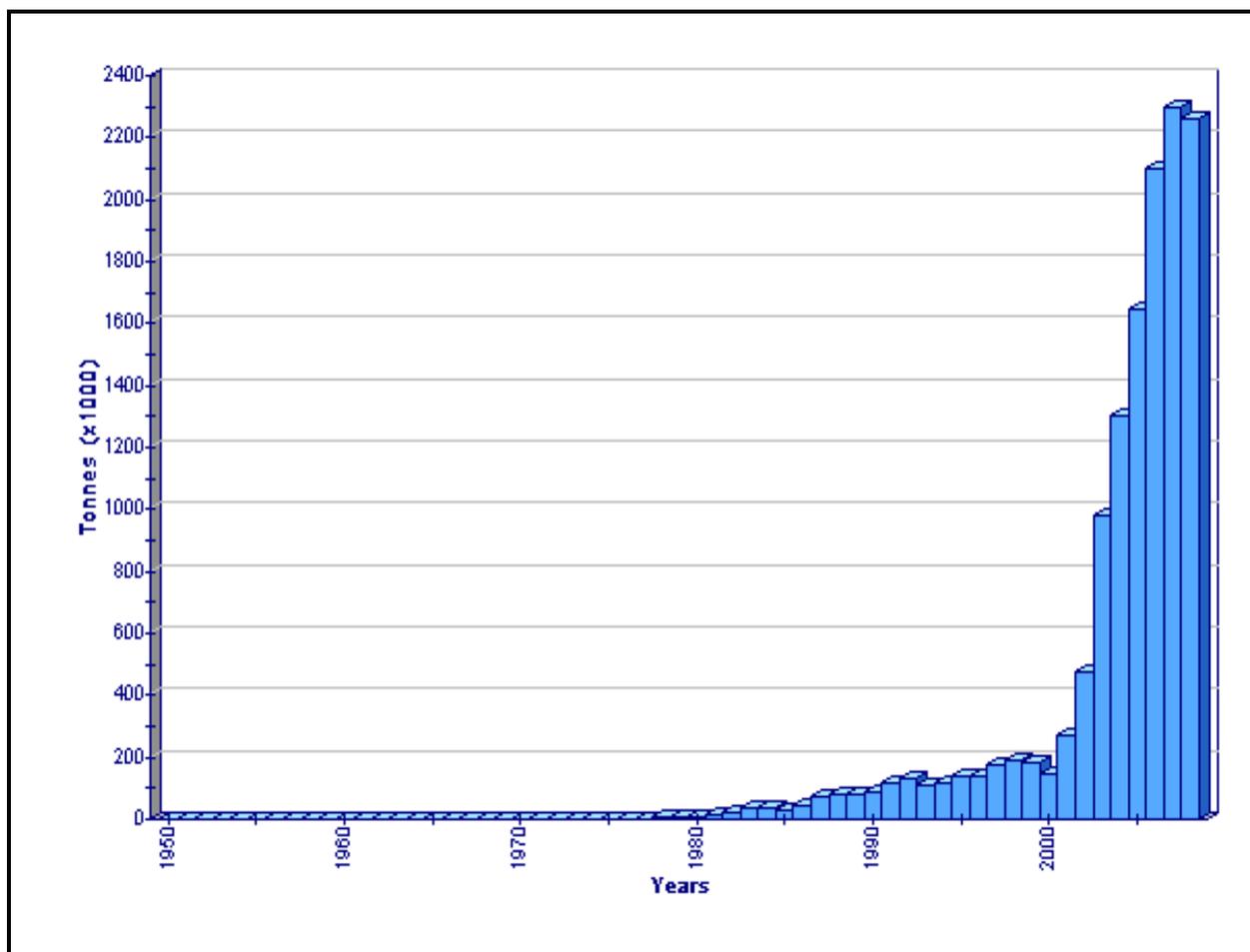
La FAO establece que dentro de los principales países productores de *P. vannamei* se incluyen: China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Ecuador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Belice, Viet Nam, Malasia, P.C. de Taiwán, Islas del Pacífico, Perú, Colombia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Estados Unidos de América, India, Filipinas, Camboya y Jamaica. (FAO, 2006a).

A pesar de que a la FAO no le fue reportada producción alguna en 1.999, en el año 2.004 se registraron casi 1.116.000 en China, la Provincia China de Taiwán y Tailandia, sin embargo debido a los temores relativos a la importación de enfermedades exóticas, varios países asiáticos se han mostrado reacios a impulsar el cultivo de *P. vannamei*, por lo que su cultivo se mantiene oficialmente confinado a pruebas experimentales en Camboya, India, Malasia, Myanmar y Filipinas. Tailandia e Indonesia, permitiendo su libre cultivo comercial pero manteniendo restricciones oficiales permitiendo únicamente la importación de progenitores libres de patógenos específicos (SPF) o resistentes (SPR). De manera similar, la mayoría de los países Latinoamericanos tienen leyes de estricta cuarentena para prevenir la importación de agentes patógenos exóticos con la importación de nuevas cepas. (FAO, 2006a).

En América Latina, el total de la producción de granjas de *P. vannamei* se incrementó de 8.000 toneladas en 1.980 a 194.000 toneladas en 1.998. Tras un pequeño declive en 1.999 y otro más significativo en el año 2.000 debido a la irrupción de la enfermedad de manchas blancas (WSSV), las estadísticas de FAO indican un rápido crecimiento de la producción a más de 1.386.000 toneladas en 2.004 tal y como se puede observar en la figura 4 (FAO, 2006b).

A partir de 1.980 que se inician las importaciones de postlarvas de *P. vannamei* (desde Texas, USA), se obtiene el primer desove de reproductores en el año 1.987 en Venezuela, esto estimuló a las inversiones privadas ante la perspectiva de generar divisas mediante la exportación. En la década de los 90, se aceleró el crecimiento de este rubro como consecuencia de la disminución de las exigencias burocráticas de la permisería, domesticación de la especie, ausencia de enfermedades virales importantes, consolidación de nuevas inversiones privadas y las atractivas condiciones que brindaban los mercados internacionales (INSOPESCA, 2010).

En Venezuela la industria del camarón cultivado actualmente presenta grandes perspectivas para su desarrollo, debido a las extensas áreas de tierras y aguas apropiadas que hacen factibles este cultivo, según el Instituto Socialista de la Pesca y Acuicultura (INSOPESCA). Desde hace más de 20 años existe un interés en el cultivo controlado de camarones marinos, esto se ha fundamentado en la creciente demanda y el elevado precio que ha tenido este recurso en los mercados nacionales e internacionales (Briceño y col., 2006).



**Figura 4.** Producción acuícola global de *Penaeus vannamei* en América Latina. Fuente: (FAO, 2006a).

El crecimiento de la camaronicultura ha sido impulsado con la promulgación del Decreto de Ley de Pesca y Acuicultura de la República Bolivariana de Venezuela del 2.001, ya que al ser considerada como una de las actividades prioritarias y con gran potencial, se establecieron condiciones adecuadas para promover su desarrollo, en especial en materia arancelaria, resultando para el año 2.002 una participación del 67% del total de la producción acuícola nacional, y logrando alcanzar en apenas dos años posteriores su máximo registro de producción, reportando 24.000TM en aproximadamente 6.500 hectáreas de cultivo, distribuidas en los estados Zulia (60%), Falcón (30%), Anzoátegui (7%), Sucre (2%) y Nueva Esparta (1%) (INSOPECA, 2010). Según Marmol y col. (2004), el 75% del peso del espécimen es desecho “conchas”, por consiguiente considerando que la producción es de 24.000TM se podría inferir que 18.000TM corresponden a conchas que podrían usarse como materia prima para la obtención de quitosano.

La actividad se lleva a cabo en los estados costeros tales como: Zulia (costa del Lago de Maracaibo), Falcón, Anzoátegui, Sucre y Nueva Esparta. A nivel gubernamental, se han venido destinando nuevas áreas para proyectos de camaronicultura, tal como es el caso de los estados centrales Miranda y Carabobo, donde anteriormente no se habían desarrollado este tipo de actividades (FAO, 2006).

Para 1.995 la producción nacional por hectárea era de 1.065 TM/año, con apenas siete granjas camaroneras, y para el 2.003 la producción nacional era de 5.500 TM, con 25 granjas dedicadas al cultivo de *P. vannamei* en Venezuela. Con el crecimiento acelerado de la camaronicultura en los últimos años, la producción de camarón cultivado representó el 67% de la producción acuícola total de Venezuela en el año 2.002 (Briceño y col., 2006).

### **2.3 Películas compuestas.**

Las películas compuestas solo por hidrocoloides o por lípidos actúan como buenas barreras o tienen buenas propiedades mecánicas pero no ambas características a la vez. Las películas a base de proteínas son muy eficientes como barreras al oxígeno pero su resistencia a la transmisión del vapor de agua es limitada debido a la naturaleza hidrofílica de proteínas y polisacáridos.

Por otra parte las películas lipídicas proveen buena barreras a la humedad pero son frágiles, con agujeros y grietas en la superficie de la película, pobre adherencia, carencia de homogeneidad y sabor a cera (Cha y Chinnan, 2004). Sin embargo, cuando se combinan proporciones específicas de los diferentes materiales (hidrocoloides y lípidos) se puede obtener la formulación de la película compuesta que presenta las características idóneas.

### **3. Películas antimicrobianas.**

Las películas comestibles pueden servir como transporte de agentes antimicrobianos que pueden extender la vida útil del producto y reducir el riesgo del crecimiento de patógenos en la superficie del mismo (Pranoto y col., 2005). Los agentes antimicrobianos son agregados dentro de la formulación de la película y son liberados en la superficie del alimento para el control del crecimiento microbiano.

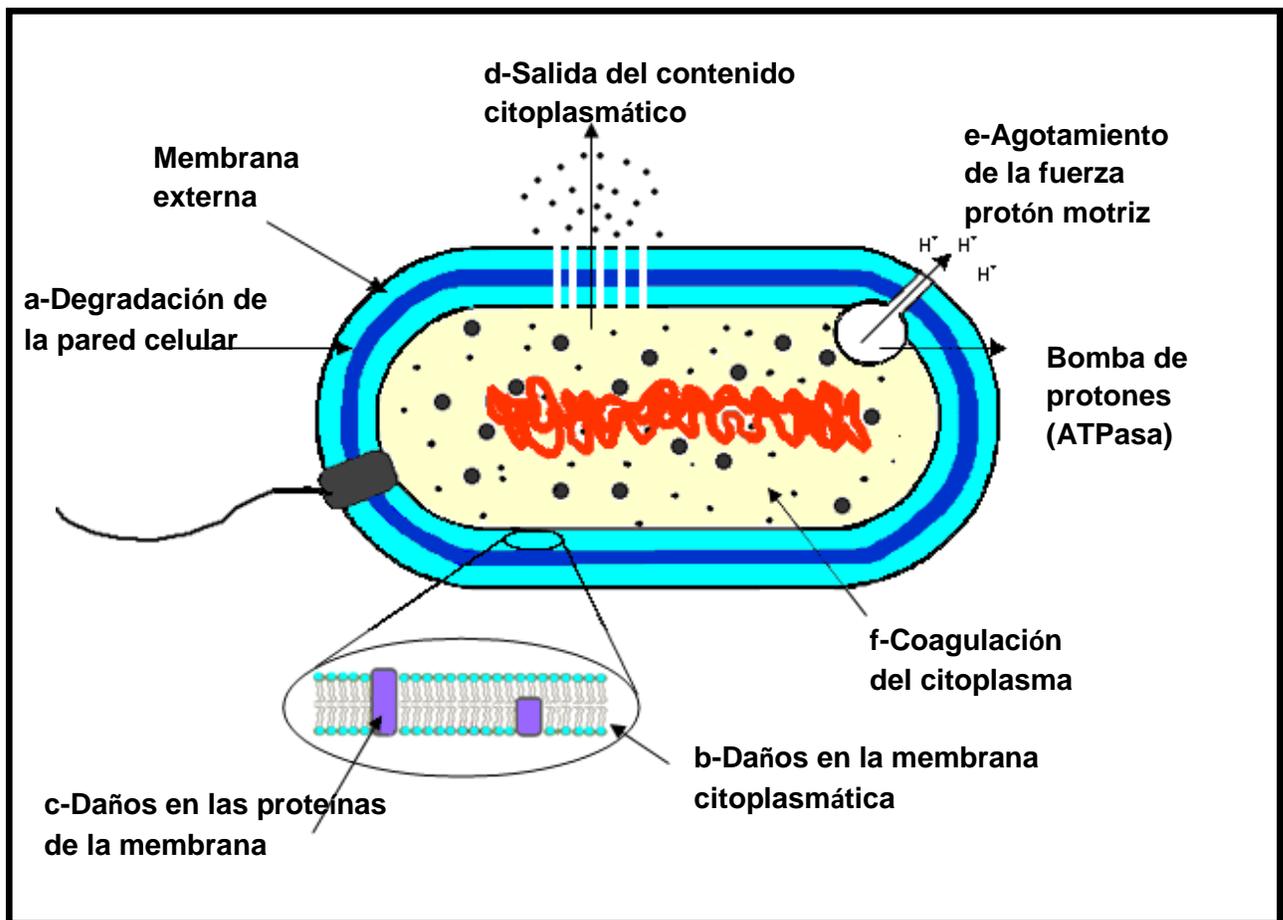
Los compuestos más comúnmente usados como preservativos y antimicrobianos incluyen a los benzoatos, propionatos, sorbatos, parabenos, agentes acidificantes (ácido acético, láctico, etc.),

agentes de curado (cloruro de sodio y nitrato de sodio), bacteriocinas y preservativos naturales (aceites esenciales, lisozima, humo líquido), etc. (Cha y Chinnan, 2004).

Los aceites esenciales han sido estudiados intensamente por muchos investigadores (Burt, 2004) debido a su habilidad por proteger a los alimentos contra bacterias patógenas que contaminan a los alimentos. También son considerados como alternativa a los preservativos químicos y su uso en alimentos cumple con las exigencias de demandas de los consumidores para productos mínimamente procesados (Rojas y col., 2007).

Los aceites esenciales son responsables del olor y del aroma de las especias y hiervas, los cuales pueden ser agregados a las películas comestibles para modificar el sabor/olor e introducir actividades antimicrobianas. Su actividad antimicrobiana ha sido ampliamente reconocida, sin embargo su uso se encuentra limitado por su fuerte sabor/olor. Estos compuestos presentan componentes fenólicos así como ácido ursólico, carnosol, quienes presumiblemente son los responsables de la acción antimicrobiana (Cagri, 2004).

El mecanismo de acción exacto de los aceites esenciales no se conoce en detalle, debido a que al parecer no se trata de un único mecanismo sobre los componentes de la célula, sino a la acción de los compuestos en diferentes partes u organelos. En general se ha señalado que los aceites esenciales pueden degradar los componentes de la pared celular, causar daños a las proteínas de la membrana citoplasmática, liberación del contenido de la célula, coagulación del citoplasma y reducción de la fuerza protón-motriz, tal como lo muestra la figura 5. (Raybaudi y col., 2009).



**Figura 5.** Mecanismos de acción de aceites esenciales y sus componentes en la célula. La figura ilustra los posibles modos de acción de los diferentes aceites esenciales. Fuente: Raybaudi y col. 2009.

Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*).

*O. vulgare* de la familia Lamiaceae, es una planta que vive más de dos años; de tallo recto, que alcanza entre 30 y 80 centímetros, cuadrado, ramificado en la parte más alta y totalmente cubierto de pelusilla blanca. Las hojas brotan de dos en dos en cada nudo, enfrentadas, son enteras, ovaladas, acabadas en punta, también se recubren de pelusilla por ambas caras y su longitud es de hasta 4 centímetros. Las flores se disponen en verticilastros que forman espiguillas de hasta 3 centímetros; las flores son muy pequeñas (los pétalos no sobrepasan los 2 ó 3 milímetros de longitud), de color violeta rosado, rezuman unas gotitas de un líquido amarillento aromático. Esta planta es altamente conocida por sus propiedades terapéuticas y está siendo usada en la agricultura, farmacia e industrias cosméticas (Souza y col. 2007).

El aceite esencial de orégano presenta actividades biológicas, antimicrobianas y antioxidantes que pueden cambiar dependiendo de diferencias en el cultivo, origen, estado vegetativo y estaciones del año, debido a las diferencias en los patrones de biosíntesis de los monoterpenos (Sahin y col. 2004). *O. vulgare* tiene como principales constituyentes terpinen-4-ol,  $\beta$ -caryophyllene,  $\gamma$ -terpinene, timol y carvacrol (Mockute y col. 2001).

Aceite esencial de ajo (*Allium sativum*).

*A. sativum* comúnmente conocido como ajo, es una hortaliza cuyo bulbo se emplea en la cocina mediterránea, es de sabor fuerte, especialmente en crudo y ligeramente picante. Se agrupa dentro de la familia de las amarilidáceas. Es una planta perenne de la familia de la cebolla, las hojas son planas y

delgadas, de hasta 30 cm de longitud y las raíces alcanzan fácilmente profundidades de 50 cm o más. El bulbo, de piel blanca, forma una cabeza dividida en bulbos comúnmente llamados dientes. Cada cabeza puede contener de 6 a 12 dientes, cada uno de los cuales se encuentra envuelto en una delgada película de color blanco o rojizo. Las flores son blancas, y en algunas especies el tallo también produce pequeños bulbos o hijuelos. El aceite esencial de ajo es un producto extraído de los bulbos a través de un proceso de destilación (Pranoto y col. 2005).

Los componentes del aceite de ajo principalmente son disulfuro dialilo (60%), trisulfuro dialilo (20%), propil disulfuro de alilo (16%) y una pequeña cantidad de disulfuro y polisulfuro dialilo (Pranoto y col. 2005). Yin y Cheng en el 2003 reportan que la actividad antimicrobiana característica del aceite de ajo se debe al disulfuro dialilo, la cual reveló acción antimicrobiana contra algunas bacterias patogénicas y hongos, entre los cuales se encuentra *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida* spp. y *Aspergillus* spp.

#### **4. Uso de las películas comestibles en la industria de alimentos.**

- ✓ Sistema de mantenimiento de anaerobiosis. La presencia de oxígeno es un factor que limita la vida útil del producto. La oxidación puede causar cambios en el sabor/olor y color así como también destruye nutrientes y facilita el crecimiento de microorganismos aeróbicos, insectos, etc. (Suppakul y col., 2003). Al aplicar películas comestibles en la superficie de un producto alimenticio y dependiendo de la permeabilidad que tenga la película aplicada se creará entre

ellos un ambiente limitante en oxígeno, esta limitación es un mecanismo efectivo para prevenir el crecimiento de bacterias aerobias y mantener los atributos sensoriales del producto (Suppakul y col., 2003).

- ✓ Absorción de agua. En alimentos sólidos, una cierta cantidad de humedad puede quedar atrapada durante el empaquetado o puede desarrollarse dentro del empaque debido a la permeación o generación y al menos de que se elimine podría formar gotas de condensación que conducen al deterioro del producto. Los problemas de humedad pueden surgir en diversas circunstancias, entre ellas se incluye la respiración en productos vegetales, emulsiones en helados, fluctuaciones de temperatura en empaques con alta humedad relativa, etc. (Suppakul y col., 2003). Para evitar estos problemas se pueden emplear películas que eviten la formación de gotas de condensación, es decir, que permitan la permeación de agua; de esta manera se contribuye con la conservación del producto.
  
- ✓ Sistemas con migración de antimicrobianos. Los alimentos frescos pueden contener microorganismos tanto en su superficie como en su interior, los cuales si no son destruidos provocarán el deterioro. La prevención del daño de los alimentos por inhibición o destrucción de los microorganismos es la base de la preservación de los alimentos, es aquí donde nuevas tecnologías tales como empaques antimicrobianos, enfocados en prevenir este problema y conservando las propiedades de los alimentos han surgido.

Los empaques pueden tener propiedades antimicrobianas de por sí o presentar en su formulación agentes antimicrobianos añadidos, los cuales pueden reducir la tasa de crecimiento de microorganismos y por lo tanto extender la vida útil del producto manteniendo su calidad e inocuidad

(Suppakul y col., 2003). Dentro de este tipo de empaques se encuentran las películas antimicrobianas, las cuales al ser aplicadas sobre el alimento pueden permitir la difusión de los agentes antimicrobianos a la superficie del alimento retardando el crecimiento microbiano y por lo tanto asegurando la inocuidad del producto. Estas películas pueden ser usadas sobre quesos, frutas, jamón, etc. La tabla 4 muestra la aplicación de algunos biopolímeros a los cuales fueron incorporados agentes antimicrobianos en productos alimenticios.

**Tabla 4.** Aplicación de los biopolímeros con antimicrobianos para la protección de alimentos.

Biopolímeros	Agentes antimicrobianos	Alimento
<b>Polisacáridos</b>		
Almidón y derivados	Sorbato de potasio	Fresas
<b>Celulosa y derivados</b>		
Celulosa		Carnes
Papel a base de celulosa	Pediocina	Queso/ Jamón
MC/HPMC – ácidos grasos	Nisina/Lacticina 3147	
	Sorbato de potasio	
MC – ácido palmítico	Sorbato de potasio	
HPMC – ácidos grasos	Nisina	Tomates
HPMC	Etanol/ Ác. Cítrico/ Ác. Acético/ sorbato de potasio	Pescados
Alginato	Glucosa oxidasa	Carne de res
	Nisina	Leche desnatada
	Nisina	
	Nisina	
	Nisina/EDTA/Lisozima/GFSE	Aves de corral

Elaborado a partir de: Cha y Chinnan (2004)

Metil celulosa (MC)

Hidroxi propil metil celulosa (HPMC).

Continuación de la tabla 4. Aplicación de los biopolímeros con antimicrobianos para la protección de alimentos.

Biopolímeros	Agentes antimicrobianos	Alimento
Carragenina	Clortetraciclina/ oxitetraciclina/ neomicina/ polimixina B/ micostatina/ nisina / EDTA/ lisozima	Aves de corral
Quitosano	Benzoato de sodio/ Sorbato de potasio Ácido acético/propiónico Ácido acético/propiónico	Carnes
Agar	Nisina	Aves de corral
<b>Proteínas</b>		
Zeína del maíz	Lisozima/ nisina Nisina/ ácido láurico/ EDTA	
Proteína de soya	Lisozima/ nisina	
Proteína de suero	Sorbato de potasio p-aminobenzóico/ ácido sórbico	
Proteína de trigo	Ácido sórbico	

Elaborado a partir de: Cha y Chinnan (2004)

## OBJETIVO GENERAL

Extraer compuestos de origen natural como quitosano y almidón a partir de subproductos como las conchas de camarones (*Penaeus vannamei*) y recursos subutilizados como el ocumo chino (*Colocasia esculenta*) respectivamente, y aprovecharlos para la formulación de películas comestibles con propiedades antimicrobianas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extraer quitosano a partir de conchas de camarones (*Penaeus vannamei*) para la formulación de películas con propiedades antimicrobianas.
- ✓ Extraer almidón a partir de ocumo chino (*Colocasia esculenta*) para la formulación de películas antimicrobianas.
- ✓ Formular películas a partir de quitosano y almidón con propiedades antimicrobianas logradas por la incorporación de sustancias de origen natural como el aceite esencial de orégano y de ajo.
- ✓ Medir las propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de las películas formuladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **FASE 1. Extracción y caracterización de quitosano y almidón obtenido a partir de productos naturales subutilizados (conchas de camarones y ocumo chino).**

**1.1 Extracción de almidón de tubérculos de ocumo chino *Colocasia esculenta*.** Para la obtención del almidón a partir de ocumo chino, se utilizó la metodología reportada por Pérez y col. (1993), con ligeras modificaciones. Se pelaron y cortaron los tubérculos en cubos de 2 cm aproximadamente, los cuales se colocaron en bolsas herméticas marca Ziploc para su posterior congelación, esto con la finalidad de liberar con mayor facilidad el almidón contenido en el tubérculo. Posteriormente la muestra se sometió a un proceso de molienda empleando una licuadora y se filtró en coladores de tela muselina, para luego descartar la fibra y someter el filtrado a centrifugación en una centrífuga (CRU-5000, Needham Heights-EEUU) por 30 minutos a 1800rpm. Se eliminó el sobrenadante y se conservó el sedimento, el cual se sometió al proceso de secado empleando un desecador de bandeja marca Mitchell Dryers modelo 700H de New York-EEUU a 45°C por 24 horas. Después de moler para obtener el almidón en polvo, se pasó por un tamiz de 60 Mesh, finalmente se determinó el grado de humedad, rendimiento y porcentaje de pureza del almidón obtenido (Figura 6).

**1.1.1 Humedad.** Se determinó el porcentaje de humedad de acuerdo con la metodología descrita por la AOAC (2002). El porcentaje de humedad se calculó por la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

Las mediciones de humedad se realizaron por cuadruplicado (n=4).

**1.1.2 Rendimiento.** Indica el porcentaje de almidón que se obtiene una vez procesado una determinada cantidad de materia prima, para ello se pesó la materia prima descascarada y el almidón obtenido. El rendimiento se determinó por la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso de almidón (g)}}{\text{Peso de materia prima (g)}} \times 100$$

La determinación del rendimiento del proceso de extracción se realizó por cuadruplicado (n=4).

**1.1.3 Pureza.** Parámetro que se obtiene por diferencia al restar del 100% el porcentaje del resto de los compuestos presentes en el almidón (proteínas, materia grasa y cenizas).

$$\text{Pureza} = 100\% - (\% \text{proteínas} + \% \text{materia grasa} + \% \text{cenizas})$$

**1.1.3.1 Proteínas:** Se determinó según el método aprobado de la AOAC, 2002. Las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado (n=4).

**1.1.3.2 Materia grasa:** Se determinará según el método aprobado de la AACC, 2000. Las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado (n=4).

**1.1.3.3 Cenizas:** Se determinará según el método aprobado de la AACC, 2003. Las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado (n=4).

**1.2 Extracción de quitosano a partir de la concha de camarón *Penaeus vannamei*.** De acuerdo con la metodología reportada por Parada y col. (2004) con modificaciones, las conchas de los crustáceos fueron lavadas, desinfectadas y despojadas de los restos de tejido, luego se sometió esta materia a un proceso de molienda con un molino de piedra con tamiz, posteriormente se aplicaron los procesos de desproteínización (eliminación de proteínas) con NaOH 10%, blanqueamiento (despigmentación del quitosano) con NaClO comercial y desmineralización (extracción de minerales) con solución HCl 10%, para obtener la quitina. Dicha quitina, se sometió al proceso de desacetilación con NaOH al 80% en baño de María 110°C por 3 horas, de esta manera se suprimen los grupos acetilos obteniendo quitosano (Figura 7).

El quitosano fueron caracterizados en términos de:

- ✓ Humedad.
- ✓ Rendimiento.
- ✓ Grado de desacetilación.

**1.2.1 *Humedad*.** Se determinó el porcentaje de humedad de acuerdo con la metodología descrita por la AOAC (2002). El porcentaje de humedad se calculó por la ecuación

señalada en el punto 1.1.1. Las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado (n=4).

**1.2.2 Rendimiento.** Indica el porcentaje de quitosano que se obtiene una vez procesada una determinada cantidad de materia prima, para ello se empleó la metodología ya descrita en el punto 1.1.2. Las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado (n=4).

**1.2.3 Grado de desacetilación.** Este parámetro fue determinado basándonos en la metodología reportada por Parada y col. (2004) con modificaciones, para ello se realizó la valoración potenciométrica empleando un pHmetro Hanna instruments pH211 Microprocessor pH Meter, siendo calibrado con las soluciones tampones de pH 4,1 y 7. Para la determinación del contenido de grupos aminos de las distintas muestras de quitosano se procedió a la titulación de 0,5 g de cada uno de ellos por separado en 20 mL de HCL 0,3 M, luego se tituló con una solución de NaOH 0,1M, valorada previamente. Se procedió a medir el cambio de pH provocado al agregar 1mL de base, esta adición se realizó de forma lenta y con agitación continua para evitar posible precipitación del biopolímero. Las medidas se realizaron por triplicado.

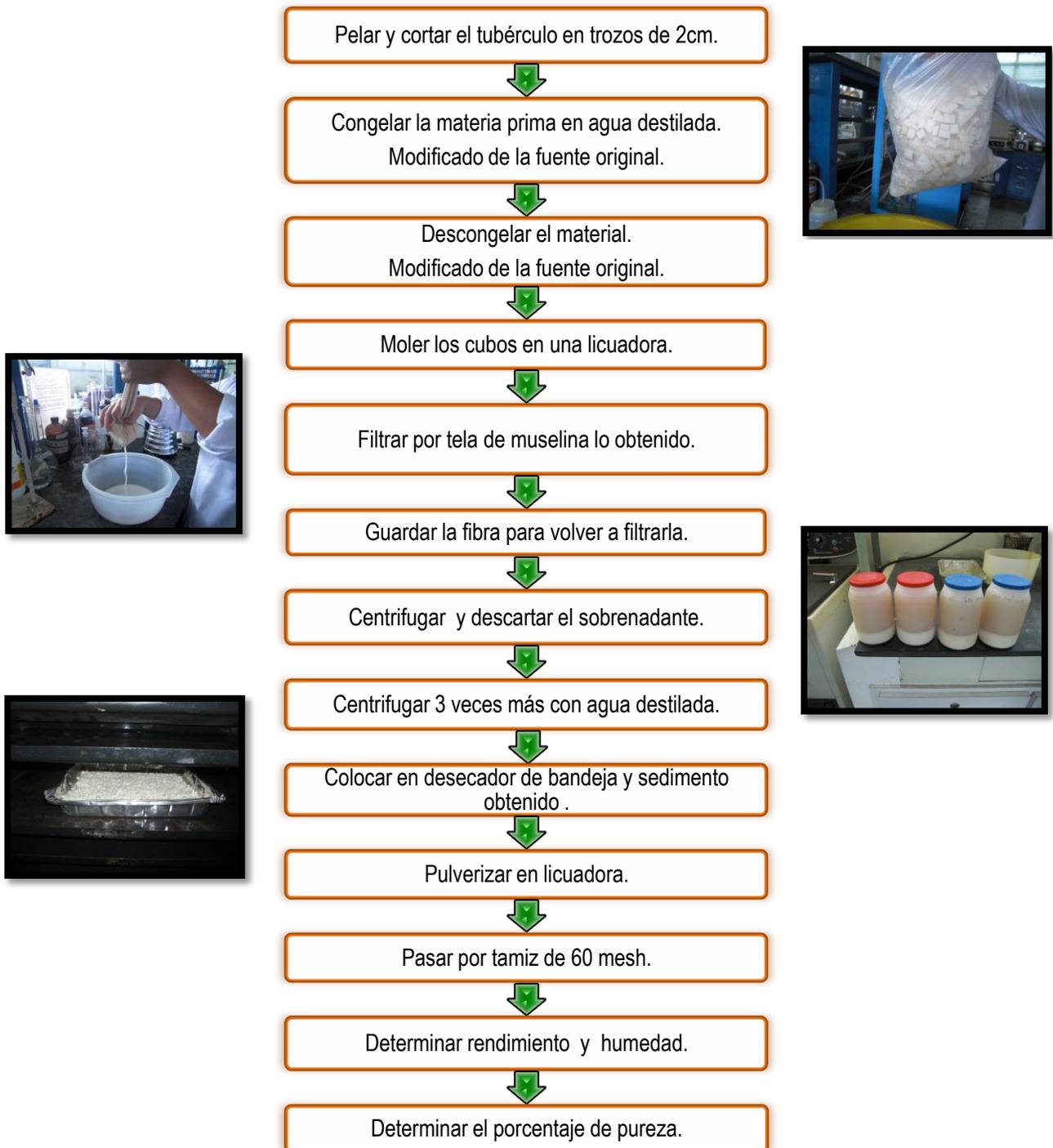
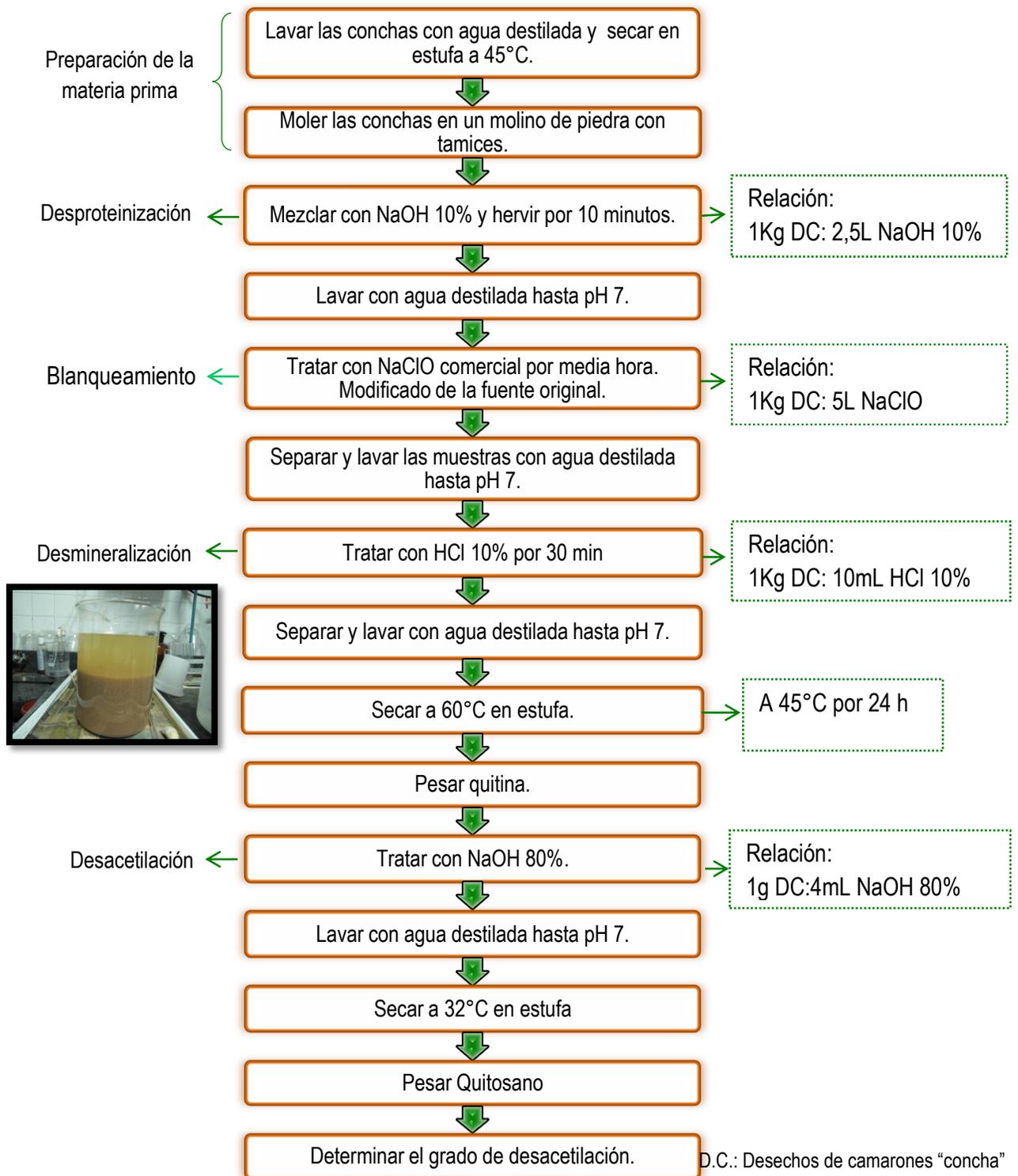


Figura 6. Metodología aplicada para la extracción de almidón a partir de ocumo chino (*Colocasia esculenta*),

basada en la metodología planteada por Pérez y col., 1993 con ligeras modificaciones.



**Figura 7.** Metodología aplicada para la extracción de quitosano a partir de conchas de camarón (*Penaeus vannamei*), basada en la metodología reportada por Parada y col. 2006 con ligeras modificaciones.

## **FASE 2. Estudios preliminares para determinar la formulación base de las películas comestibles.**

**2.1 Determinación de las formulaciones ideales a base de almidón de ocumo chino.** En base a la metodología reportada por Romero y col., (2005) y Bertuzzi y col. (2007), se realizaron una serie de soluciones de concentración creciente de almidón de ocumo chino, glicerol y aceite de Canola con Omega-3 especificado en la tabla 5, para luego someterlas al proceso de gelatinización y posterior secado. Una vez obtenida la formulación base, se procede a despegar seleccionando las formulaciones que cumplan con los siguientes requisitos:

1. Maleabilidad.
2. Manejabilidad.
3. Resistencia al desprender.
4. Ausencia de exudación de aceite.
5. Grosor adecuado.

**2.2 Determinación de las formulaciones ideales a base de quitosano.** En base a la metodología reportada por Bégin y col., (1999) y Sangsuwan y col., (2008), se realizaron una serie de soluciones de concentración creciente de quitosano, glicerol, aceite de Canola con Omega-3 y ácido láctico especificado en la tabla 5, para luego someterlas al proceso de gelatinización y posterior secado. Una vez obtenida la formulación base, se procede a despegar seleccionando las formulaciones que cumplan con los siguientes requisitos mencionados en el punto 2.1.

**Tabla 5.** Concentraciones de los componentes de las formulaciones de películas a base de almidón de ocumo chino y quitosano probadas.

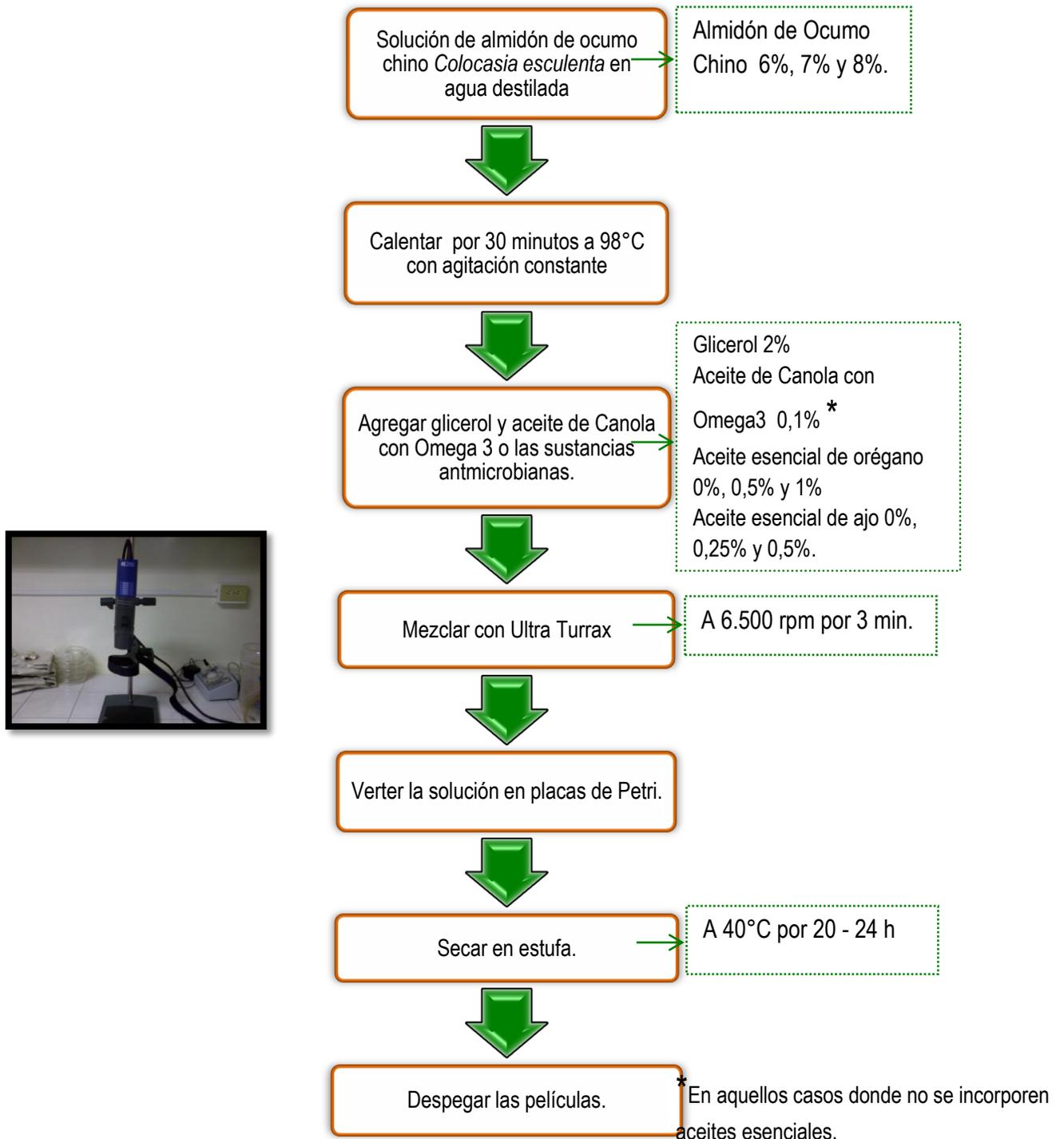
Componente	Proporción de los componentes para película a base de almidón de ocumo chino (%)	Proporción de los componentes para Películas a base de quitosano (%)
	1	2
	2	3
	3	4
	4	5
	5	
<b>Polímero</b>	6	
	7	
	8	
	9	
	10	
<b>Glicerol</b>	1	1
	2	2
<b>Aceite de Canola con Omega-3</b>	0,05	0,05
	0,1	0,1
	0,15	0,15
<b>Ácido láctico</b>	0	1
	0	2

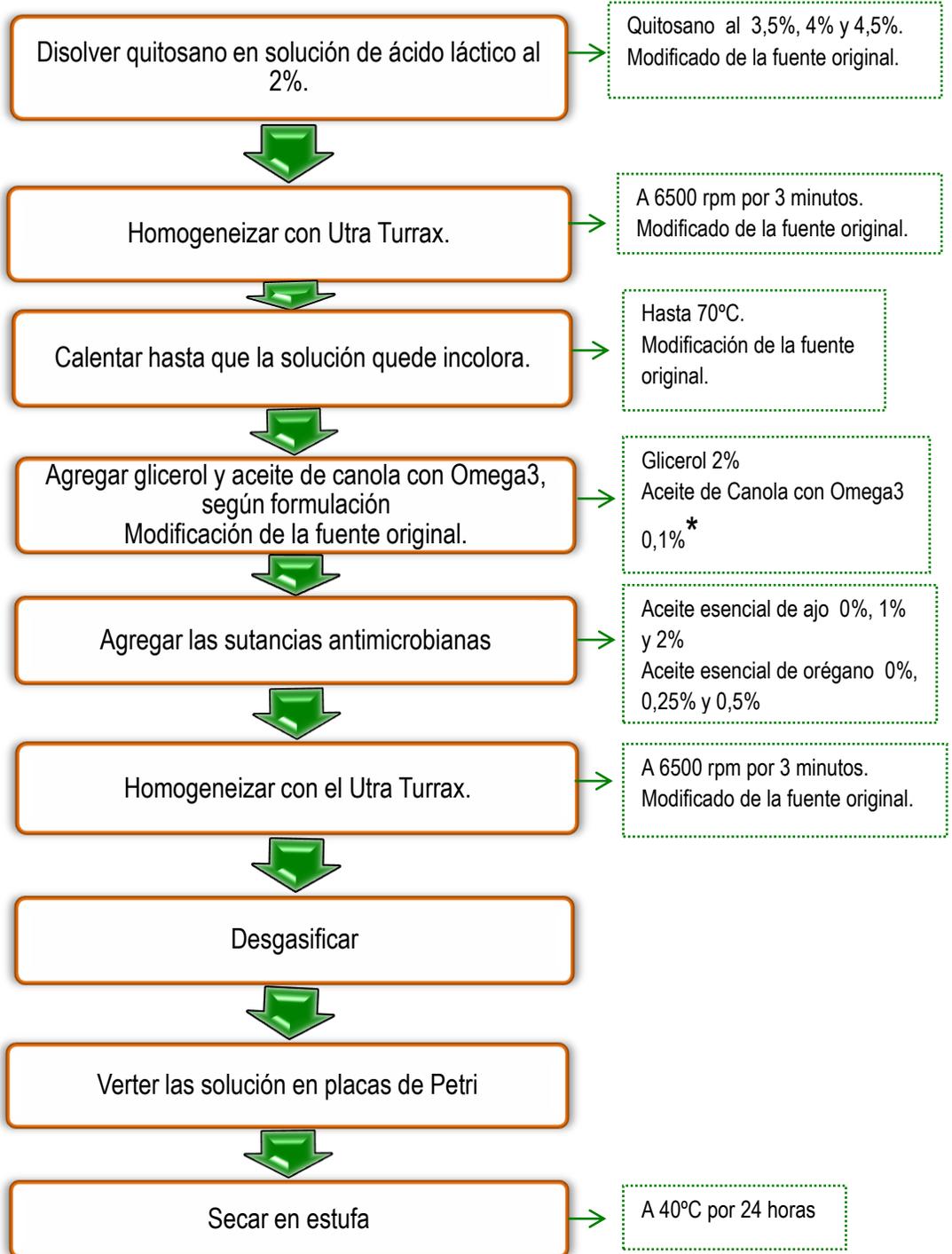
### **FASE 3. Formulación de las películas antimicrobianas comestibles.**

**3.1 Formulación de las películas a base de almidón de ocumo chino (*Colocasia esculenta*).** De acuerdo a las metodologías propuestas por Romero y col. (2005) y Bertuzzi y col. (2007) con algunas modificaciones y en base a los resultados obtenidos de la formulación ideal de las películas de almidón, se prepararon soluciones de almidón de ocumo chino (*Colocasia esculenta*) de diferentes concentraciones (6%, 7% y 8%) en agua destilada, calentando por 20 min a 98°C con agitación constante. Luego se agregó glicerol al 2% y aceite de Canola con Omega 3 al 0,1% (solo en aquellos casos en los cuales no se emplearon aceites esenciales). Además se consideraron formulaciones que incluían aceite esencial de orégano (0%, 0,5% y 1%) y/o de ajo (0%, 0,25% y 0,5%), para impartir a las películas propiedades antimicrobianas. Los diferentes ingredientes de las formulaciones fueron

mezclados con un equipo Ultra Turrax, (modelo T 25 basic, EEUU) a 6.500 rpm por 3 min. Si la formulación presentó burbujas, se procedió a desgasificar evitando de esta manera su formación en la solución que puedan dar fragilidad a las películas. La solución obtenida fue vertida en placas de Petri y sometidas al proceso de secado en una estufa a 40°C por 20 – 24 horas, finalmente se procedió a despegar las películas. Las formulaciones fueron preparadas en dos oportunidades cada una por duplicado (n=4) (Figura 8). El proyecto inicial contemplaba el empleo de Noni como sustancia antimicrobiana, sin embargo fue modificado debido a que imparte coloración indeseable a la película.

**3.2. Formulación de las películas a base de Quitosano.** Basándonos en la metodología reportada por Bégin y col., 1999 y Sangsuwan y col., 2007 con ligeras modificaciones y de acuerdo a los resultados obtenidos de la formulación ideal de las películas de quitosano, se prepararon soluciones de quitosano al 3,5%, 4% y 4,5% en ácido láctico al 2%, y se mezclaron con el equipo Ultra Turrax, (modelo T 25 basic, EEUU) a 6.500 rpm por 3 min. Posteriormente se procedió a calentar hasta 70°C para que la solución quede incolora y a continuación se incorpora glicerol (2%), y aceite de Canola con Omega 3 (0,1%) (solo para el caso de las películas que no presenten aceites esenciales). También se emplearon sustancias antimicrobianas tales como: aceite esencial de orégano (0%, 0,5% y 1%) y/o aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%), impartiendo así propiedades antimicrobianas a las películas formuladas. Si la formulación presentó burbujas, se procedió a desgasificar evitando de esta manera su formación en la solución que puedan dar fragilidad a las películas, luego las soluciones obtenidas se colocaron en placas de Petri y se secaron a 40°C por 24 horas. Las formulaciones fueron preparadas en dos oportunidades cada una por duplicado (n=4) (Figura 9). El proyecto inicial contemplaba el empleo de Noni como sustancia antimicrobiana, sin embargo fue modificado debido a que imparte coloración indeseable a la película.





**Figura 9.** Formulación de las películas antimicrobianas a base de quitosano, basada en la metodología reportada por Bégin y col., (1999) y Sangsuwan y col., (2008), con ligeras modificaciones.

#### **FASE 4. Propiedades de las películas antimicrobianas comestibles.**

**4.1 Propiedad de barrera: Permeabilidad al vapor de agua.** En base a la metodología reportada por Tapia y col., (2007), la permeabilidad al vapor de agua fue determinada gravimétricamente. Las películas objeto de medición fueron cortadas en discos de 3 cm de diámetro y colocadas sobre cápsulas de metilmetacrilato con 5mL de agua destilada. Posteriormente se colocó sobre las películas un aro para mantenerlas sujeta a la cápsula. Estas cápsulas fueron puestas en desecadores sellados herméticamente, que contenían como agente desecante una solución saturada de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  a  $25^\circ C$ , lo cual permitió que la humedad relativa se mantuviera en 33,3%, tal como se puede apreciar en la figura 10a. Las cápsulas fueron pesadas cada 40 min durante 8 horas. Dos repeticiones de cada análisis fueron realizadas, cada una con duplicado (n=4).

La transferencia de vapor de agua por las películas ( $m_1$ , pendiente de la curva de la pérdida de peso en el tiempo en g/s) se estimó por regresión lineal. La Tasa de transmisión de vapor de agua (TPVA) por las películas se determinó dividiendo  $m_1$  entre el área de la película en estudio.

$$TPVA = \frac{m_1}{A} = \frac{g}{m^2s}$$

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$PVA = \frac{L \times TPVA}{p_i - p_a}$$

Siendo “L” el promedio del grosor de las películas en metros, “pa” la presión externa de la cápsula la cual es igual a 1,046 kPa y “pi” la presión interna de la cápsula la cual es igual a 3,17 kPa (Tapia y col., 2007).

**4.2 Propiedad estructural: Solubilidad en agua.** La solubilidad en agua fue determinada en base a las metodologías reportadas por Maizura y col., (2007) y Tapia y col., (2007). Para esto, se cortaron 6 trozos de películas de 2 cm X 3 cm para cada formulación. Cuatro de las muestras fueron pesadas y puestas en beakers de 100 mL con 30 mL de agua destilada, sellados con parafina por 24 horas a temperatura ambiente, tal como se puede apreciar en la figura 10b. Las piezas remanentes fueron filtradas usando papel Whatman No.11, posteriormente se secaron en una estufa a 60°C hasta que se alcanzó el peso constante. Las otras 2 muestras fueron secadas hasta que su peso llegó a ser constante. El porcentaje de solubilidad fue determinado utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Solubilidad = \frac{\text{Peso materia seca inicial} - \text{Peso de materia seca final}}{\text{Peso materia seca inicial}} \times 100$$

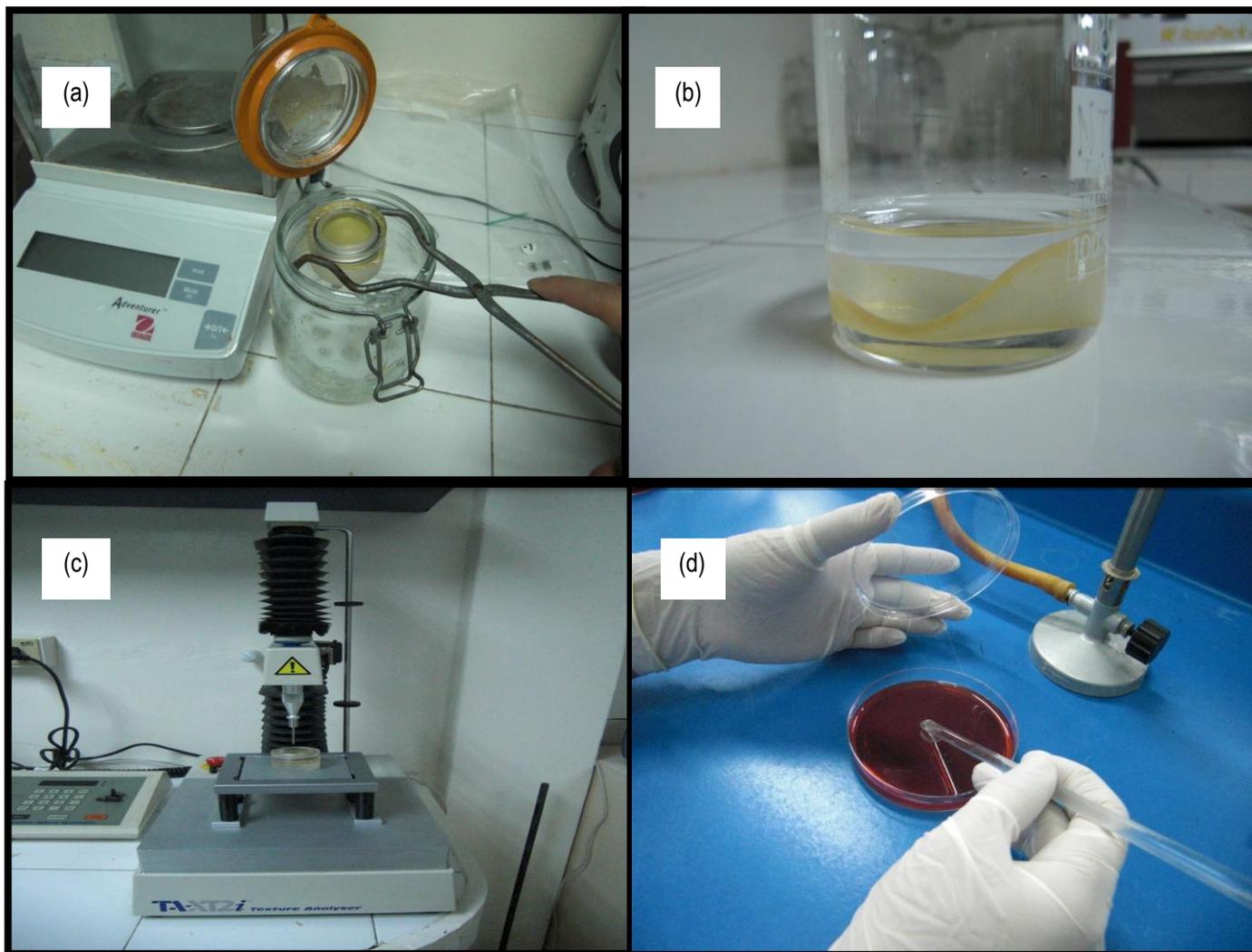
Dos repeticiones de cada análisis fueron realizadas, cada una con duplicado (n=4).

**4.3 Propiedad mecánica: Resistencia a la punción.** Esta propiedad mecánica fue determinada en base a las metodologías reportadas por Mali y col., (2004). El grado de resistencia a la punción de las películas fue determinado utilizando un analizador de textura TA-TX2 (Stable Micro Systems Ltd., England, UK) a través de la fuerza necesaria que se debe aplicar para penetrar la película en estudio. El equipo fue calibrado con pesas de 2Kg y 5Kg y para la

realización de este estudio se empleó una sonda P2N Aguja. Se estableció que la distancia de bajada a emplear fue de 5cm y la velocidad de penetración 5mm/s con retorno automático. Para esto las películas formuladas se cortaron en discos de 3 cm de diámetro y fueron puestas sobre cápsulas de metilmetacrilato y ajustadas con unos aros, este sistema se posicionó cuidadosamente de manera que la aguja penetrara en el centro de la película tal como puede apreciarse en la figura 10c. Dos repeticiones de cada análisis se llevaron a cabo, cada una con cuadruplicado (n=8).

**4.4 Propiedad funcional: actividad antimicrobiana.** Se prepararon placas de Petri con Agar Palcam y Agar Hektoen Entérico (para las películas que no presentaron acción antimicrobiana) y Agar Trypticase de Soya (para las películas que presentaron acción antimicrobiana), y se inocularon con un cultivo puro de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica* Serovariedad Enteritidis con un nivel de  $10^8$  UFC/mL para ambos casos. Luego de manera aséptica se cortaron discos a partir de las películas formuladas con diferentes concentraciones de sustancias antimicrobianas añadidas y fueron colocadas sobre las placas previamente preparadas e inoculadas de acuerdo a la metodología sugerida por Bauer y col., (1996). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y 30°C por 48 horas para *S. entérica* Ser. Enteritidis y *L. monocytogenes* respectivamente, tal como se observa en la figura 10d. Finalmente fueron observados y medidos los diámetros de los halos de inhibición alrededor de los discos que se encontraban sobre las placas con agar. Dos repeticiones de cada análisis fueron realizadas, cada una con cuadruplicado (n=8). Controles en donde la formulación de la

película no contenga las sustancias antimicrobianas fueron también llevados a cabo para fines de comparación.



**Figura 10.** Montajes experimentales realizados para evaluar diversas propiedades a las películas comestibles formuladas. (a) Permeabilidad al vapor de agua, (b) Solubilidad en agua, (c) Punción, (d) Acción antimicrobiana.

### **FASE 5. Análisis estadístico de los resultados.**

Un análisis factorial de múltiples niveles fue utilizado para poder evaluar el efecto de diferentes concentraciones de los materiales base (quitosano o almidón) para las películas, glicerol, aceite de Canola con Omega 3 o sustancias antimicrobianas (aceite esencial de orégano y de ajo) sobre las propiedades mecánicas, de barrera, solubilidad en agua y antimicrobianas de las películas formuladas (anexos 1a y 1b). Los resultados obtenidos fueron procesados utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI a tal forma de determinar las formulaciones ideales o con mejores propiedades y Statistica 9 para desarrollar el análisis estadístico pertinente determinando si hay o no diferencias significativa entre tratamientos.

## RESULTADOS

### **FASE 1. Extracción y caracterización de quitosano y almidón obtenido a partir de productos naturales subutilizados (conchas de camarones y ocumo chino).**

Los procesos de extracción realizados permitieron la obtención de materia prima con un amplio rango de aplicaciones que van desde la importación de textura y consistencia en alimentos hasta la manufactura de empaques biodegradables. La obtención de almidón se realizó a partir de tubérculos de ocumo chino (*C. esculenta*), los cuales fueron sometidos a procesos de molienda, filtración y posterior centrifugación. El quitosano se obtuvo por desacetilación química de la quitina procedente de la desproteinización y desmineralización de las conchas de camarones (*P. vanammei*).

#### **1.1 ALMIDÓN.** *Caracterización físico-química, rendimiento y pureza del almidón obtenido a partir de ocumo chino (Colocasia esculenta) para su aprovechamiento como base en la formulación de películas comestibles.*

La composición proximal (contenido de grasa, proteínas y cenizas) así como también el contenido de amilosa y amilopectina son determinantes en las características estructurales y funcionales de los almidones, condicionando a estos a que puedan formar gel (Hernández, 2008), por esta razón se caracterizó el almidón obtenido a partir de ocumo chino antes de utilizarlo para la formulación de las películas.

La tabla 6 muestra el rendimiento, la pureza y la composición química (en base seca) del almidón extraído de tubérculos de ocumo chino (*C. esculenta*). En esta tabla se observa que el

rendimiento promedio fue de 11,8g/ 100g de tubérculos, valor que se encuentra dentro del rango reportado por Pérez y col., (2005) siendo de 10 - 12%. Un porcentaje de humedad de 10,34%  $\pm$ 0,23 fue encontrado para muestras de almidón extraído de ocumo chino, siendo similar al reportado por Nwokocha y col. (2009), quienes realizaron un estudio comparativo de algunas propiedades del ocumo chino y encontraron valores de 11,8% de humedad. Así mismo, es importante señalar que dicho valor se encuentra dentro del rango aceptado para productos deshidratados (INN, 1999; Nwokocha y col. 2009), lo que garantiza la estabilidad del producto en el tiempo.

Los porcentajes de proteínas (0,49%) y lípidos (0,37%) encontrados en esta investigación (tabla 6), fueron similares a los reportados por Pérez y col., (2005) quienes encontraron valores de 0,53% y 0,27% de proteínas y lípidos respectivamente para almidón de ocumo chino. De igual manera son comparables con los valores señalados por Aboubakar y col., (2008) quienes reportaron porcentajes de seis variedades de ocumo chino (*C. esculenta*) de 0,4% - 4,6% para proteínas y 0,2% - 0,6% para lípidos.

Otro componente determinado fueron las cenizas siendo de 0,33% para el almidón en estudio (tabla 6). Este valor se encuentra ligeramente por debajo del límite máximo recomendado para el cual es de 0,5% según lo señalan Nwokocha y col. (2009), lo que indica que el almidón obtenido es bastante puro.

La pureza del almidón extraído fue de 99,14%, este porcentaje es similar al reportado por Pérez y col. (2005), siendo de 98,5%, este hecho fue respaldado por medio de un análisis microscópico, en el cual no se observaron la formación de complejos entre proteínas/grasas y gránulos de almidón (figura 11). Además un análisis en las micrografías se puede detallar que los almidones son pequeños,

redondeados, medianamente truncados - elipsoidal y largos poliédricos, que se encuentran en el rango de 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 6.** Caracterización del almidón aislado de tubérculos de ocumo chino (*C. esculenta*).

Parámetro	%
Humedad	10,34 $\pm$ 0,23
Proteína cruda	0,49 $\pm$ 0,08
Materia grasa	0,37 $\pm$ 0,09
Cenizas	0,33 $\pm$ 0,09
Rendimiento	11,8 $\pm$ 1,21
Pureza	99,14 $\pm$ 0,16

Los valores son el promedio de 4 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

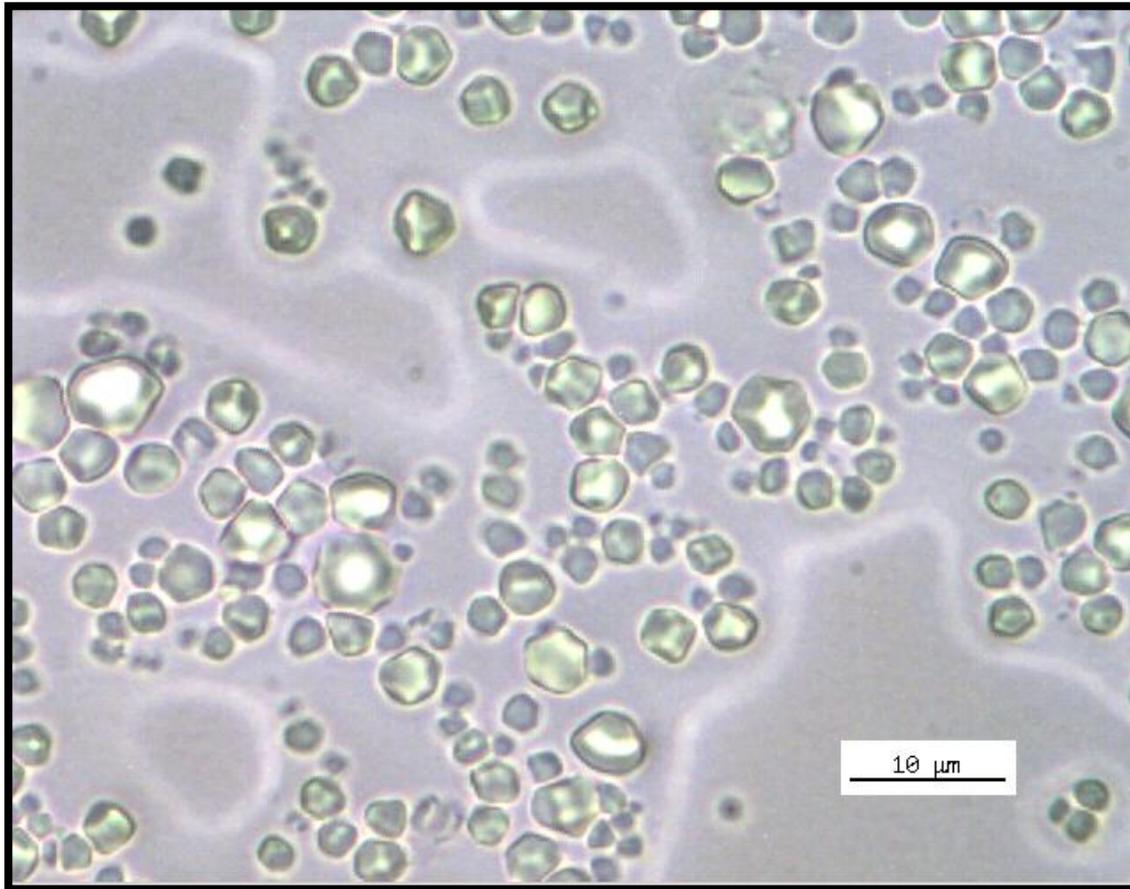
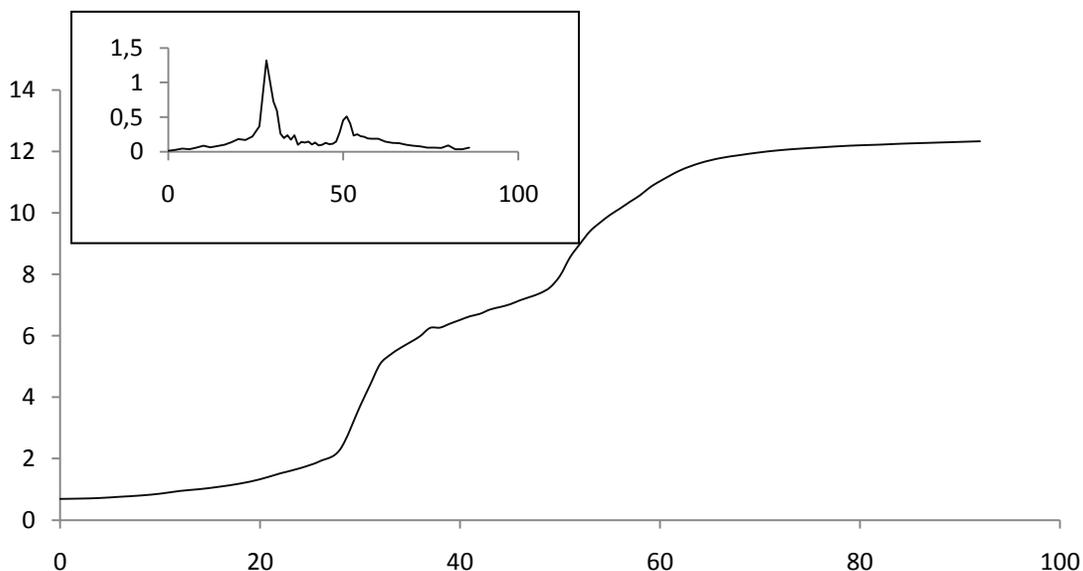


Figura 11. Micrografía de almidones aislados de tubérculos de *Colocasia esculenta* obtenidas por descripción al microscopio óptico (100 X 10).

**1.3 QUITOSANO.** *Grado de desacetilación, humedad y rendimiento del quitosano obtenido a partir del tratamiento de conchas de camarones (Penaeus vannamei) para su aprovechamiento como base en la formulación de películas comestibles.*

El grado de desacetilación indica el contenido de grupos amino que se encuentran presentes en una muestra de quitosano siendo determinado por titulación potenciométrica, la cual define las propiedades fisicoquímicas que diferencian la quitina del quitosano (Parada y col., 2004). En la figura 12 se puede apreciar que la curva de titulación obtenida presenta dos puntos de inflexión, cuyos valores se determinan según el criterio de la primera derivada, este mismo comportamiento fue reportado por Parada y col., (2004). La diferencia existente entre los puntos de inflexión en la curva de titulación corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos aminos del quitosano (Parada y col., 2004).

Los resultados obtenidos de la determinación del grado de desacetilación, humedad y rendimiento del quitosano se muestran en la tabla 7. Como se puede observar, la proporción de grupos aminos en el quitosano extraído es ligeramente mayor que en la muestra comercial previamente caracterizada por Parada y col. (2004), esto indica que el método empleado permite la obtención de quitosano altamente desacetilado (mayor proporción de grupos aminos), además los porcentajes de humedad tanto del quitosano obtenido y el comercial reportado por Mármol y col. (2006) son similares. Estos resultados indican que el quitosano obtenido de conchas de *P. vannamei* presenta parámetros similares al comercial y por lo tanto sería aprovechable para su uso a nivel industrial en la elaboración de empaques comestibles biodegradables.



**Figura 12.** Curva de titulación para el quitosano obtenido a partir de conchas de *Penaeus vannamei*. En el recuadro superior se muestra la primera derivada, donde los máximos corresponden a los puntos de inflexión.

**Tabla 7.** Composición del quitosano extraído de conchas de *Penaeus vannamei* y del quitosano comercial.

Parámetro	Quitosano obtenido	Quitosano comercial
Humedad (%)	6,7	6,74 <sup>a</sup>
Grado de desacetilación (%)	72,45	67,20 <sup>b</sup>
Rendimiento (%)	21,49	NR

<sup>a</sup>Valores reportados por Mármol y col., (2006).

<sup>b</sup>Valores reportados por Parada y col., (2004).

NR Valor no reportado.

La metodología propuesta en este proyecto para la obtención de quitosano a partir de conchas de camarón, reveló que al tratar 100g de conchas de camarones se obtienen 24,04g de quitina y 21,49g de quitosano. Mármol y col., (2006) obtuvieron quitosano a partir de conchas de *P. vannamei* con un rendimiento ligeramente superior al obtenido con la metodología empleada en esta investigación, siendo de 24,06% para el quitosano; esto puede deberse a la aplicación por estos autores de tratamientos químicos más drásticos, como por ejemplo desmineralización con HCL al 0,6N por 4horas, desproteínización con NaOH al 10% por 24horas y desacetilación con NaOH al 50% por 2horas.

## **FASE 2. Estudios preliminares para determinar la formulación base de las películas comestibles.**

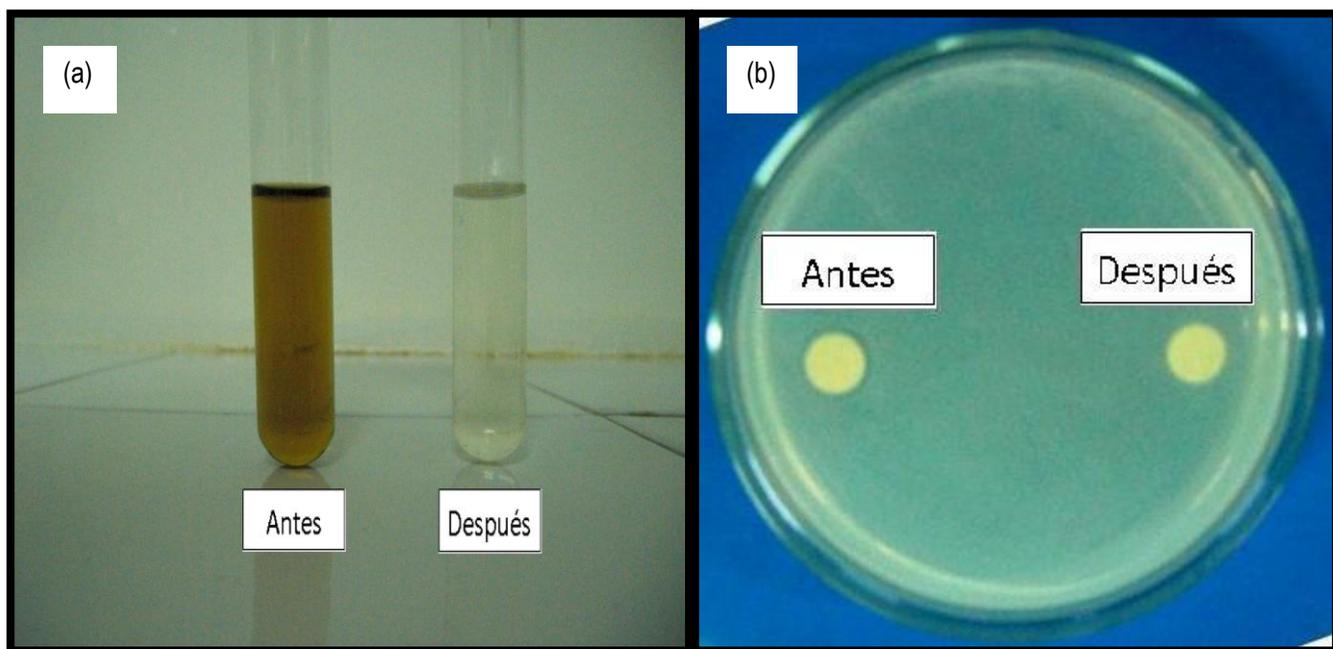
### **2.1 Formulaciones ideales a base de almidón de ocumo chino y quitosano.**

Diversas formulaciones distintas fueron realizadas para hallar la formulación ideal a base de almidón de ocumo chino variando la concentración de dicho polímero, glicerol y aceite, de las cuales se seleccionaron aquellas que cumplieron los siguientes criterios: maleabilidad (que pueda doblarse sin quebrarse), manejabilidad (que no se adhiera a las manos trayendo como consecuencia la deformación de la película), resistencia al desprender, ausencia de exudación de aceite en la superficie y que presenten el grosor adecuado. De esta manera resultó que 6%, 7% y 8% eran las concentraciones de almidón de tubérculos de ocumo chino (*C. esculenta*) ideales para desarrollar el diseño experimental (anexo 1a), adicionando 2% de glicerol y 0,1% de aceite de canola con omega-3 (en el caso de las formulaciones que no presentan aceites esenciales como sustancias antimicrobianas).

Para hallar la formulación ideal a base de quitosano se realizaron diversas formulaciones variando la concentración de quitosano, glicerol y aceite, de las cuales se seleccionaron aquellas que cumplieron los criterios anteriormente descritos, obteniéndose que 3,5%, 4% y 4,5% eran las concentraciones de quitosano ideales para formular las películas y por lo tanto para desarrollar el diseño experimental (anexo 1b), adicionando 2% de glicerol y 0,1% de aceite de canola con omega-3 (en el caso de las formulaciones que no presentan aceites esenciales como sustancias antimicrobianas).

El proyecto inicial proponía emplear como sustancia antimicrobiana extractos de noni, sin embargo al realizar las pruebas preliminares se observó la aparición de una coloración indeseable en las películas, que si fuesen aplicadas sobre el producto podrían afectar la aceptabilidad por parte del consumidor. Para solucionar este inconveniente se sometió una solución filtrada de noni al 2% a carbón activado con agitación constante por 30min, obteniéndose reducción del color (figura 13a), sin embargo este tratamiento trajo como consecuencia la pérdida de las propiedades antimicrobianas contra *S. entérica* (figura 13b).

El carbón activado, es un derivado del carbón que debido a diversos tratamientos se convierte en un material que presenta una gran cantidad de microporos (poros menores a 2 nanómetros), por lo tanto posee un área superficial muy alta que resulta eficiente para los fenómenos de adsorción (Brown y col., 2004). Tanto las moléculas que dan origen a la coloración en la solución de noni como las que imparten actividad antimicrobiana se adhirieron a la superficie del carbón activo y en sus poros, ocasionando tanto la pérdida de color como la acción antimicrobiana, debido a esto se decidió emplear aceite esencial de ajo en su lugar.



**Figura 13.** Tratamiento de una solución de noni al 2% en carbón activado. (a) Diferencias en la coloración de la solución de noni y (b) acción antimicrobiana contra *Salmonella entérica* Ser. Enteritidis antes y después del tratamiento.

### **FASE 3. Formulación de las películas antimicrobianas comestibles.**

#### **3.3 ALMIDÓN.** *Formulación de las películas a base de almidón de ocumo chino (Colocasia esculenta) mediante la aplicación de un diseño factorial de múltiples niveles.*

Un diseño factorial de múltiples niveles fue aplicado considerando las concentraciones de almidón de ocumo chino previamente seleccionadas (6%, 7% y 8%) en combinación con glicerol (2%) y aceite de canola con omega 3 (0,1%) o aceites esenciales de orégano (0%, 0,5% y 1%) y/o ajo (0%, 0,25% y 0,5%), para evaluar las propiedades antimicrobianas sobre *L. monocytogenes* y *S. entérica* Ser. Enteritidis, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, y resistencia a la punción (anexo 1a).

#### **3.4 QUITOSANO.** *Formulación de las películas a base de quitosano mediante la aplicación de un diseño factorial de múltiples niveles.*

De la misma manera que para la formulación de las películas a base de almidón de ocumo chino, se aplicó un diseño factorial de múltiples niveles considerando las concentraciones de quitosano previamente seleccionadas (3,5%, 4% y 4,5%) en combinación con glicerol (2%) y aceite de canola con omega 3 (0,1%) o aceites esenciales de orégano (0%, 0,5% y 1%) y/o ajo (0%, 0,25% y 0,5%), para evaluar las propiedades antimicrobianas sobre *L. monocytogenes* y *S. entérica* Ser. Enteritidis, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, y resistencia a la punción (anexo 1b).

#### **FASE 4. Propiedades de las películas antimicrobianas comestibles.**

##### ***4.1 Propiedad de barrera: Permeabilidad al vapor de agua.***

Una de las principales funciones de las películas es evitar o disminuir la transferencia de vapor de agua entre el alimento y la atmósfera que los rodea, o entre dos componentes de un producto heterogéneo. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es un factor importante en la selección del material de envasado de alimentos, debido a que afecta la vida útil del producto (Rojas, 2006). Esta propiedad se encuentra influenciada por diversos factores como lo son el grosor de las películas, concentración de glicerol o cualquier otro compuesto plastificante, presencia de sustancias hidrofóbicas y la concentración del polímero a emplear para la formulación de las películas comestibles (anexo 2e y 2f).

Tanto las películas comestibles a base de almidón como las de quitosano, presentan uno de los mayores problemas asociados a elevados valores de permeabilidad. Esto se debe al carácter hidrofílico de las moléculas de dichos polímeros, las cuales hacen que las películas no ofrezcan buenas barreras para la transferencia de vapor de agua, siendo necesaria la adición de lípidos para contrarrestar el flujo de vapor de agua por medio de la película comestible (Rojas y col., 2006; Srinivasa y col., 2007).

Según Mali y col. (2004), las películas exhiben un incremento en la PVA cuando la concentración de glicerol “plastificante” aumenta. El comportamiento de aumento en la PVA debida a plastificantes es atribuido a que su presencia en la matriz polimérica podría modificarla haciéndola menos densa, que junto con el carácter hidrofílico de los plastificantes podrían favorecer la adsorción y desorción de las moléculas de agua. Por otra parte el aumento del grosor en películas de almidón

provoca un aumento en la PVA debido a que los compuestos hidrofílicos forman un transporte extremadamente complejo que facilita el flujo de vapor a través de la matriz. Aunque en este proyecto se incorporó glicerol al 2% en la formulación base, no se evaluó el comportamiento de la PVA en función de los agentes plastificantes debido a que no se emplearon concentraciones sucesivas de glicerol; tampoco se evaluó el comportamiento de la PVA en función al grosor.

La concentración del polímero a emplear en la formulación de la película es otro factor que afecta la PVA. En la tabla 8 y en las figura 14 y 15, se muestran los cambios en la PVA de las películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino (6%, 7% y 8%) con la incorporación de aceites esenciales, encontrándose que la PVA varían significativamente ( $p < 0,05$ ) al variar la concentración de almidón empleado en su formulación (anexo 2a). De esta manera, las películas elaboradas a base de ocumo chino exhiben un incremento significativo en la PVA cuando se emplea una mayor concentración de almidón en la formulación de las mismas, lo cual puede ser explicado por el aumento de grupos hidroxilos que podrían mejorar las interacciones con el agua favoreciendo su flujo a través de las películas (Mali y col. 2004). Mali y colaboradores en el 2004 encontraron el mismo comportamiento en películas de almidón de ñame, reportando valores de PVA que van desde  $2,53 \times 10^{10}$  g/m<sup>2</sup>sPa para películas con 3,3% de almidón de ñame a  $2,57 \times 10^{10}$  g/m<sup>2</sup>sPa para películas con 4% del mismo polímero.

A diferencia del comportamiento observado de las películas de almidón, las películas a base de quitosano mostraron un aumento significativo en la PVA a medida de que la concentración de quitosano disminuía (tabla 9 y anexo 2b), lo que podría deberse a la naturaleza catiónica del polímero que junto al aumento de las interacciones que acortan las distancias entre las moléculas, forman una película más compacta y ofrecen resistencia al paso de vapor de agua a través de las películas (Srinivasa y col.,

2007; Li y col., 2010). Valores de PVA similares a los mostrados en el presente trabajo de investigación son reportados por Pinotti y col. (2007) quienes obtuvieron valores de  $7,24 \times 10^{10}$  g/m<sup>2</sup>sPa para películas de quitosano nativo al 2%, y Li y col. (2010) quienes obtuvieron valores de  $3,53 \times 10^{10}$  g/m<sup>2</sup>sPa para películas con 1% del polímero en cuestión.

Por otra parte, cuando las películas comestibles a base de almidón de ocumo chino y quitosano presentan compuestos de naturaleza lipídica en su formulación, la PVA se verá influenciada por la concentración y características de los lípidos empleados. En la figura 14 y 15 se observa que los valores de PVA disminuyen cuando la fracción de aceite esencial de orégano y/o ajo aumenta para las películas a base de almidón de ocumo chino y de quitosano, siendo las diferencias significativas dependiendo de la concentración de aceite empleado (Anexo 2cy 2d). Esto se debe a que si bien, la transferencia de vapor de agua a través de la película ocurre por la fracción hidrofílica, la presencia de sustancias hidrofóbicas como los aceites esenciales describen un comportamiento en contra de la transferencia de humedad, por lo que al aumentar la concentración de aceite esencial de orégano y/o ajo la transferencia de vapor de agua a través de las películas disminuye significativamente, resultados similares son reportados por Rojas y col. (2006) quienes reportaron valores de  $6,17 \times 10^{10}$  g/m<sup>2</sup>sPa para películas elaboradas a base de puré de manzana que contenían 0,1% aceite de orégano.

Diversas investigaciones han reportado el efecto en la PVA debida a la incorporación de compuestos lipídicos en películas comestibles, Maizura y col. (2007) obtuvieron valores que van de  $5,1 \times 10^{10}$  g/m<sup>2</sup>sPa para películas de almidón de sago:alginato hasta  $4,9 \times 10^{10}$  g/m<sup>2</sup>sPa para el mismo tipo de películas que contenían 0,3% de aceite de limón.

Más aún, las películas elaboradas a base de ocumo chino y quitosano que presentan en su formulación combinaciones de aceites esenciales de orégano y ajo, a medida de que las concentraciones eran mayores, disminuirá en mayor proporción la PVA.

Sin embargo, el efecto sobre la PVA debido a la incorporación de aceite esencial de orégano en comparación con el causado por la incorporación de aceite esencial de ajo en las películas a base de los polímeros evaluados (almidón y quitosano), es mayor. Este comportamiento podría deberse a las características específicas para cada compuesto lipídico, como son tamaño, estructura de la molécula, grado de saturación, longitud de la cadena y forma (Coma, 2008). Basado entonces en los resultados, podríamos decir que las características moleculares del aceite de orégano dificultan en mayor grado el paso de vapor de agua a través de la película comestible (Seydim y Sarikus, 2005).

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 8, se puede concluir que la formulación elaborada con 6% del almidón de ocumo chino, 1% de aceite de orégano y 0,5% de aceite de ajo presentó los valores más bajos de PVA. Mientras que, dentro de las formulaciones elaboradas a base de quitosano (tabla 9), aquella elaborada con 4,5% de quitosano, 1% de aceite de orégano y 0,5% de aceite de ajo presentó los valores más bajos en PVA. Esto significa que estas películas serían más efectivas para prevenir la pérdida de humedad de los alimentos empacados, manteniendo mejor su apariencia y posiblemente la aceptabilidad por parte del consumidor.

**Tabla 8.** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino al 6%, 7% y 8%, incorporando aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% y 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 0,5% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).

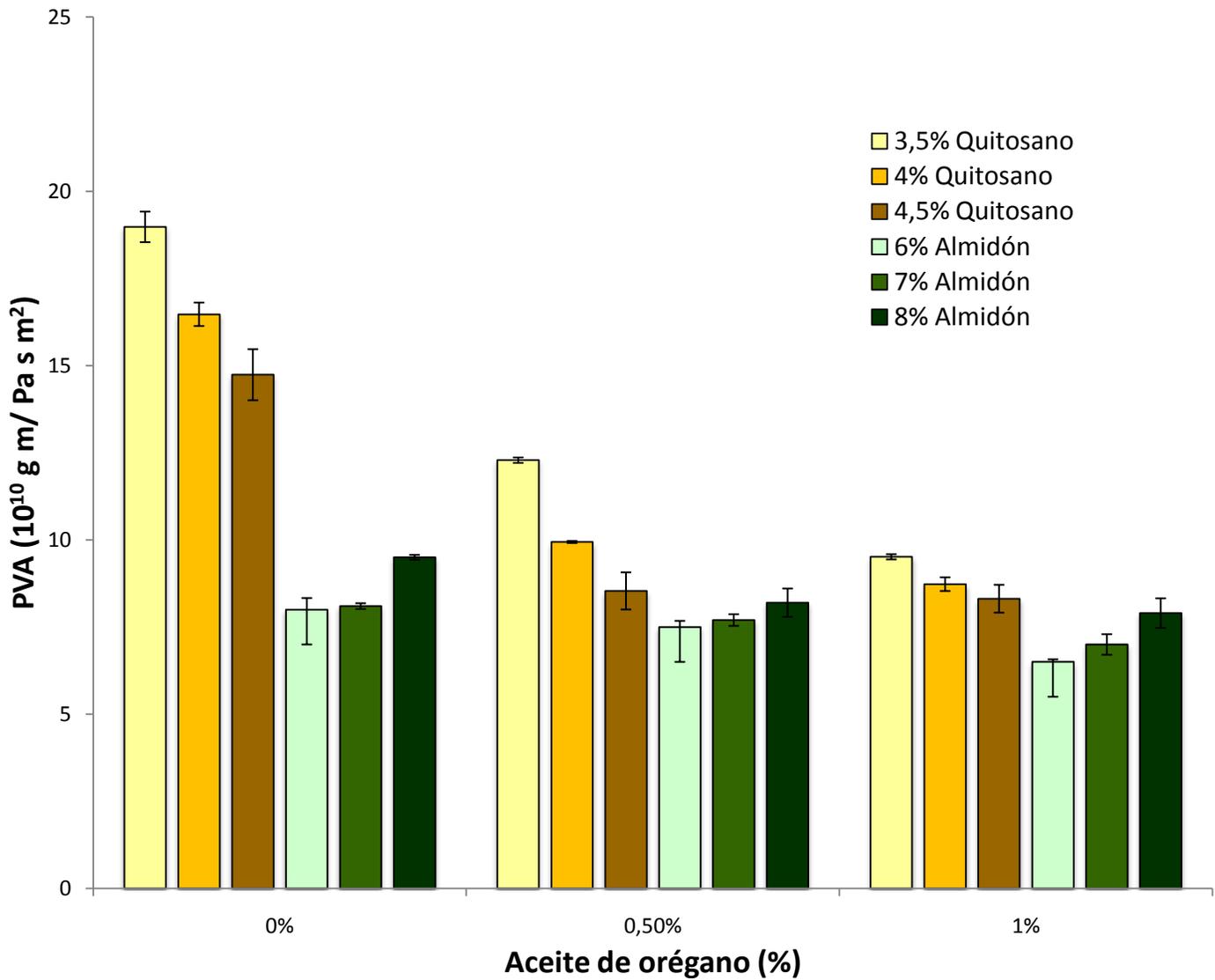
Concentración de almidón (%)	AEO		AEA		AEO + AEA	
	Concentración (%)	PVA ( $10^{10}$ gm/Pasm <sup>2</sup> )	Concentración (%)	PVA ( $10^{10}$ gm/Pasm <sup>2</sup> )	Concentración (%)	PVA ( $10^{10}$ gm/Pasm <sup>2</sup> )
6	0	8,03 ± 0,33	0	8,03 ± 0,33	0,5 + 0,25	6,71 ± 0,55
	0,5	7,54 ± 0,18	0,25	7,77 ± 0,3	0,5 + 0,5	6,01 ± 0,06
	1	6,46 ± 0,07	0,5	7,13 ± 0,09	1 + 0,25	5,75 ± 0,31
					1 + 0,5	4,71 ± 0,01
7	0	8,10 ± 0,08	0	8,10 ± 0,08	0,5 + 0,25	7,19 ± 0,02
	0,5	7,72 ± 0,17	0,25	8,17 ± 0,05	0,5 + 0,5	6,81 ± 0,39
	1	6,96 ± 0,30	0,5	7,44 ± 0,38	1 + 0,25	6,35 ± 0,26
					1 + 0,5	5,13 ± 0,09
8	0	9,47 ± 0,07	0	9,47 ± 0,07	0,5 + 0,25	7,85 ± 0,69
	0,5	8,25 ± 0,41	0,25	8,52 ± 0,37	0,5 + 0,5	7,25 ± 0,52
	1	7,87 ± 0,43	0,5	8,26 ± 0,21	1 + 0,25	6,98 ± 0,45
					1 + 0,5	6,77 ± 0,56

Cada valor de permeabilidad al vapor de agua se determinó en dos oportunidades y por duplicado para un total de  $n=4 \pm$  desviación estándar.

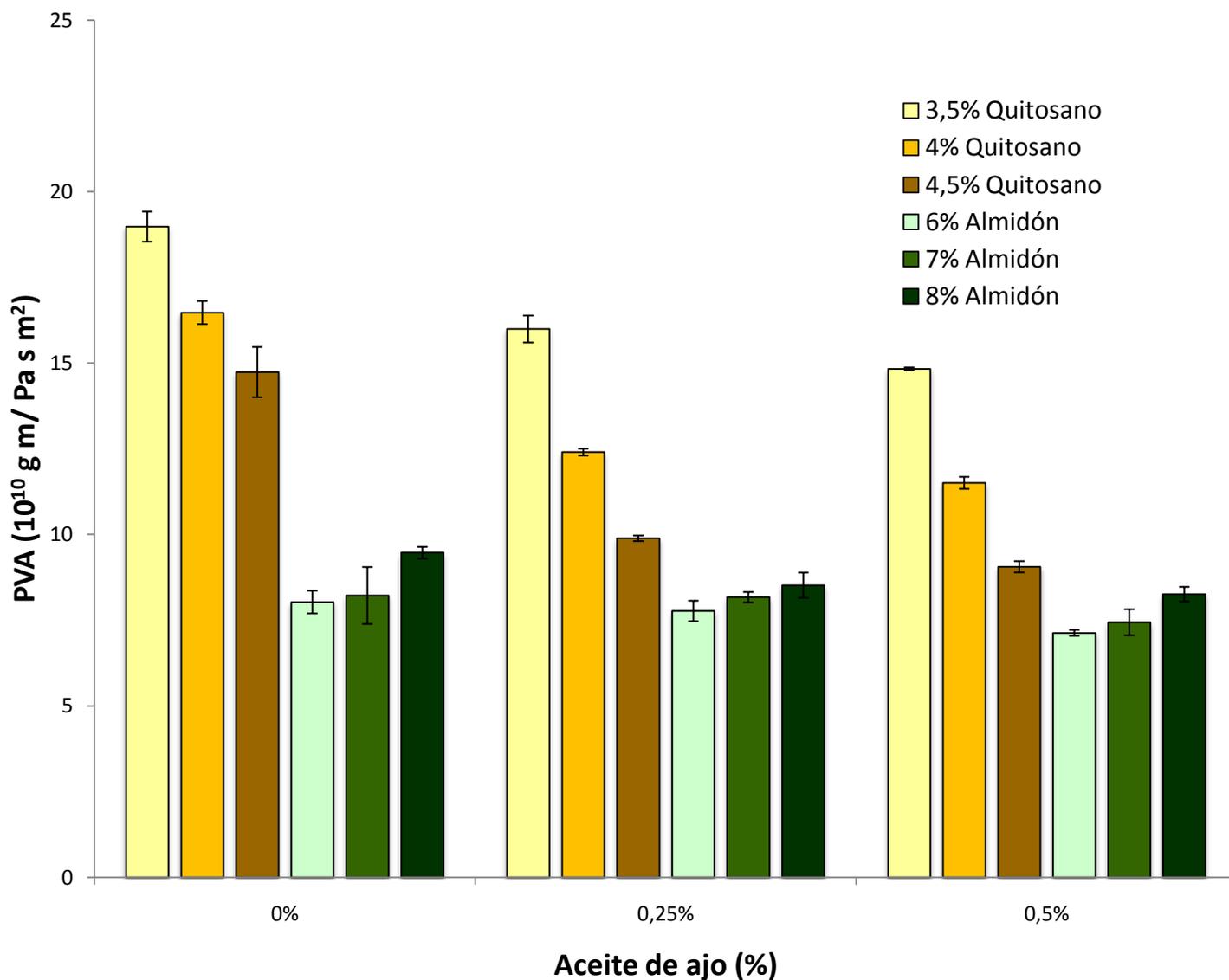
**Tabla 9.** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas comestibles elaboradas a base de quitosano al 3,5%, 4% y 4,5%, incorporando aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% y 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 0,5% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).

Concentración de quitosano (%)	AEO		AEA		AEO + AEA	
	Concentración (%)	PVA ( $10^{10}$ gm/Pasm <sup>2</sup> )	Concentración (%)	PVA ( $10^{10}$ gm/Pasm <sup>2</sup> )	Concentración (%)	PVA ( $10^{10}$ gm/Pasm <sup>2</sup> )
3,5	0	18,98±0,44	0	18,98±0,44	0,5 + 0,25	10,01±0,2
	0,5	12,29±0,08	0,25	15,99±0,39	0,5 + 0,5	8,75±0,31
	1	9,52 ±0,07	0,5	14,83±0,04	1 + 0,25	7,78±1,38
					1 + 0,5	6,81±0,25
4	0	16,47±0,34	0	16,47±0,34	0,5 + 0,25	8,93±0,06
	0,5	9,94±0,03	0,25	12,40±0,10	0,5 + 0,5	8,20±0,08
	1	8,73±0,20	0,5	11,51±0,18	1 + 0,25	7,31±0,06
					1 + 0,5	6,43±0,10
4,5	0	14,74±0,73	0	14,74±0,73	0,5 + 0,25	8,51±0,39
	0,5	8,54±0,53	0,25	9,89±0,08	0,5 + 0,5	7,36±0,11
	1	8,31±0,08	0,5	9,06±0,16	1 + 0,25	6,91±0,08
					1 + 0,5	6,05±0,05

Cada valor de permeabilidad al vapor de agua se determinó en dos oportunidades y por duplicado para un total de n=4 ± desviación estándar.



**Figura 14.** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino al 6%, 7% y 8% y quitosano (3,5%, 4% y 4,5%), incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0%, 0,5% y 1%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).



**Figura 15.** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino al 6%, 7% y 8% y quitosano (3,5%, 4% y 4,5%), incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).

#### **4.2 Propiedad estructural: Solubilidad en agua.**

La solubilidad de las películas comestibles indica su integridad en un ambiente acuoso, por lo que alta solubilidad implica baja resistencia al agua (Romero y col. 2005). Los resultados obtenidos demostraron que la solubilidad en agua a temperatura ambiente ( $T= 25^{\circ}\text{C}$ ) es influenciada significativamente por la concentración del polímero y aceite empleado en la formulación de la película comestible (anexos 3e y 3f).

En la tabla 10 y las figuras 16 y 17 se observa que la solubilidad de las películas a base de almidón de ocumo chino aumenta significativamente al disminuir la concentración del polímero a emplear en la formulación desde 34,68% para películas a base de ocumo chino al 8% a 43,74% para películas con 6% del polímero mencionado (anexo 3a). Esto quiere decir que las películas elaboradas con 8% de almidón de ocumo chino mantienen su integridad en un ambiente acuoso a temperatura ambiente con mayor eficiencia que las elaboradas con 6% de almidón sin variar la cantidad de aceite incorporado. Este comportamiento puede deberse que el aumento en las interacciones entre las moléculas de almidón “grupos hidroxilos”, aumenta la cohesividad de la matriz biopolimérica y por lo tanto la película formulada será más compacta (Almasi y col. 2010).

De la misma manera, la solubilidad a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) de las películas a base de quitosano disminuye significativamente a medida que la concentración del polímero aumenta, siendo este el mismo comportamiento al descrito con las películas a base de almidón (tabla 11 y anexo 3b). Esta tendencia puede deberse a que al aumentar la concentración de quitosano también lo hacen las interacciones intermoleculares, lo que trae como consecuencia una disminución de las distancias entre

las moléculas y por lo tanto la película será más compacta, y podrá mantener con mayor facilidad su integridad en un ambiente acuoso (Li y col., 2010).

Al comparar la solubilidad de las películas elaboradas a base de almidón de ocumo chino con las de quitosano se puede observar que las primeras tienen menores porcentajes de solubilidad en agua. Esto puede deberse a que el almidón forma interacciones intermoleculares más fuertes, lo que le permite formar una película más resistente que puede mantener su integridad en un ambiente acuoso con mayor eficiencia en comparación con las películas a base de quitosano.

La solubilidad también se encuentra influenciada por la presencia de compuestos lipídicos. Las películas a base de almidón de ocumo chino y de quitosano mostraron una disminución significativa de la solubilidad cuando se incorporó tanto aceite esencial de orégano (0%, 0,5% y 1%) como de ajo (0%, 0,25% y 0,5%) a su formulación (figuras 16 y 17 y anexos 3c y 3d), esto puede deberse a que al aumentar la proporción de componentes hidrofóbicos en la formulación de la película, estas se hacen más insolubles en agua ya que su presencia limita las interacciones entre el agua y la matriz (Romero y col. 2005).

Sin embargo, el efecto provocado en la solubilidad en agua debida a la incorporación de aceite esencial de ajo en las películas a base de almidón de ocumo chino o quitosano resulta mayor al ocasionado cuando se incorpora en la formulación cantidades iguales de aceite esencial de orégano. Este comportamiento puede deberse a las diferencias en la composición de los aceites (partes hidrofílicas-hidrofóbicas), estructura, grado de saturación y longitud de la cadena, por lo que se podría inferir que los componentes del aceite de ajo limitan con mayor eficiencia las interacciones entre el agua y la matriz polimérica (Seydim y Sarikus, 2006 y Coma, 2008).

La formulación realizada a base de quitosano con la incorporación de combinaciones de aceites esenciales que reduce al mínimo la solubilidad en agua a temperatura ambiente, es la elaborada con 4,5% de quitosano 1% de aceite de orégano y 0,5% aceite de ajo sin embargo, las películas elaboradas a base de almidón presentan menores valores de solubilidad, por lo que para recubrir un producto alimenticio en el que se desea conservar la integridad de la película resulta apropiado el empleo de películas elaboradas con 8% de almidón, 1% de aceite esencial de orégano y 0,5% de aceite de ajo ya que mantiene mejor la integridad en un ambiente acuoso (anexos 3g, 3h y 7a).

Mehyar y Han (2004) encontraron que el porcentaje de solubilidad de películas a base de almidón de arroz y guisante incorporando 50% de glicerol fue de 44,4% y 32,0% respectivamente, mientras que Romero y col. (2005) reportaron valores de 23% y 26% para películas elaboradas a base de banana y mango respectivamente. Por lo tanto podemos indicar que la solubilidad de las películas puede depender del tipo de polímero y de la fuente de la cual se extrae, de los plastificantes y surfactante añadidos y de los compuestos lipídicos incorporados en la formulación.

**Tabla 10.** Solubilidad en agua a temperatura ambiente (T=25°C) de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).

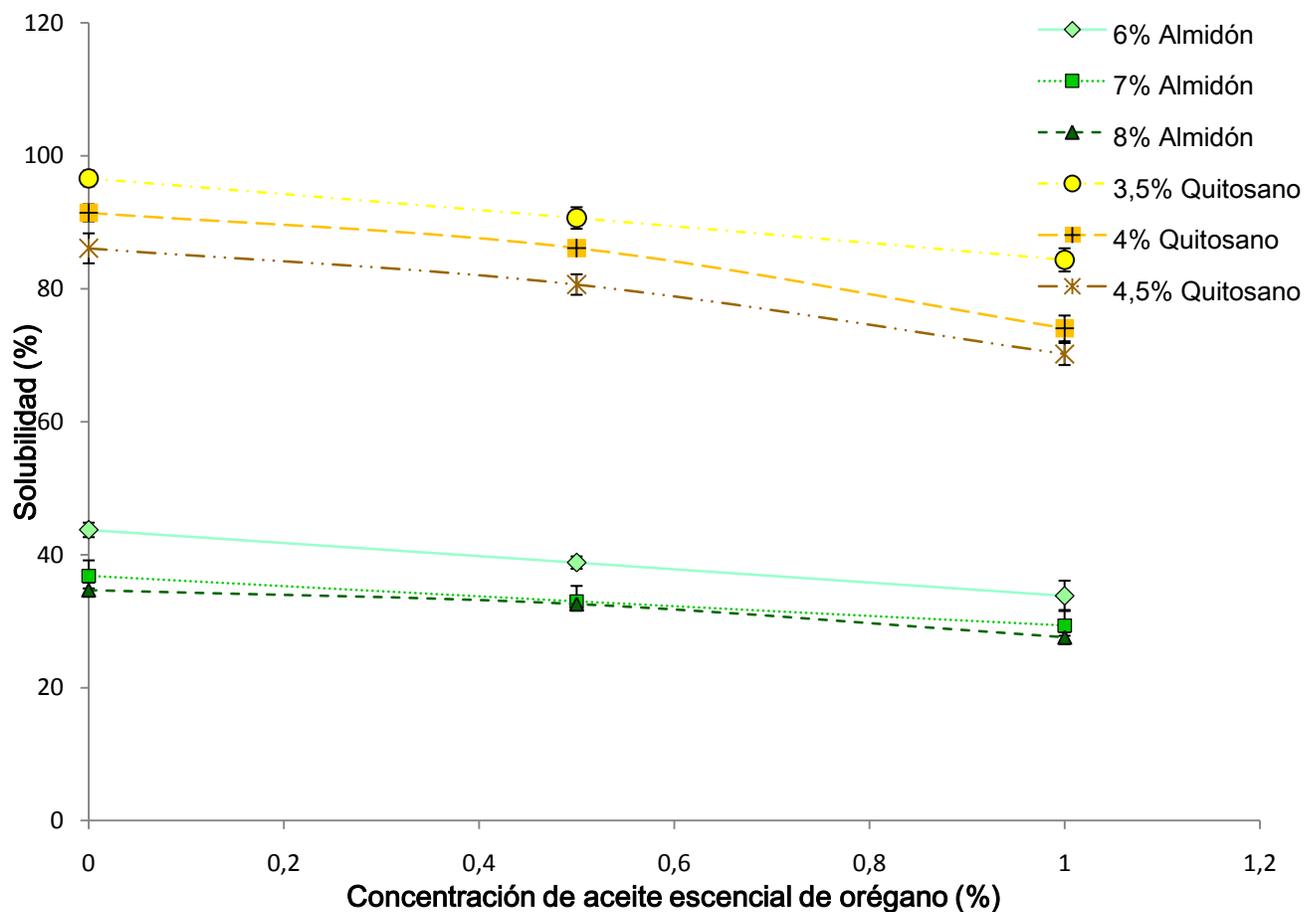
Concentración de almidón (%)	AEO		AEA		AEO + AEA	
	Concentración (%)	Solubilidad (%)	Concentración (%)	Solubilidad (%)	Concentración (%)	Solubilidad (%)
6	0	43,74 ± 1,09	0	43,74 ± 1,09	0,5 + 0,25	31,29 ± 0,12
	0,5	38,82 ± 0,93	0,25	40,41 ± 0,22	0,5 + 0,5	29,51 ± 0,24
	1	33,82 ± 2,28	0,5	36,88 ± 1,04	1 + 0,25	28,15 ± 0,24
					1 + 0,5	24,85 ± 0,62
7	0	36,81 ± 2,36	0	36,81 ± 2,36	0,5 + 0,25	29,62 ± 0,29
	0,5	32,96 ± 0,25	0,25	34,58 ± 0,40	0,5 + 0,5	28,05 ± 0,44
	1	29,34 ± 2,38	0,5	32,68 ± 0,28	1 + 0,25	26,52 ± 0,33
					1 + 0,5	24,02 ± 0,14
8	0	34,68 ± 0,26	0	34,68 ± 0,26	0,5 + 0,25	29,06 ± 0,05
	0,5	32,58 ± 0,18	0,25	33,45 ± 1,33	0,5 + 0,5	26,89 ± 0,86
	1	27,57 ± 0,22	0,5	31,91 ± 0,18	1 + 0,25	26,13 ± 0,53
					1 + 0,5	22,89 ± 0,12

Cada valor de solubilidad en agua es la medida de 2 determinaciones con 2 réplicas cada una, para un total de n=4 ± desviación estándar.

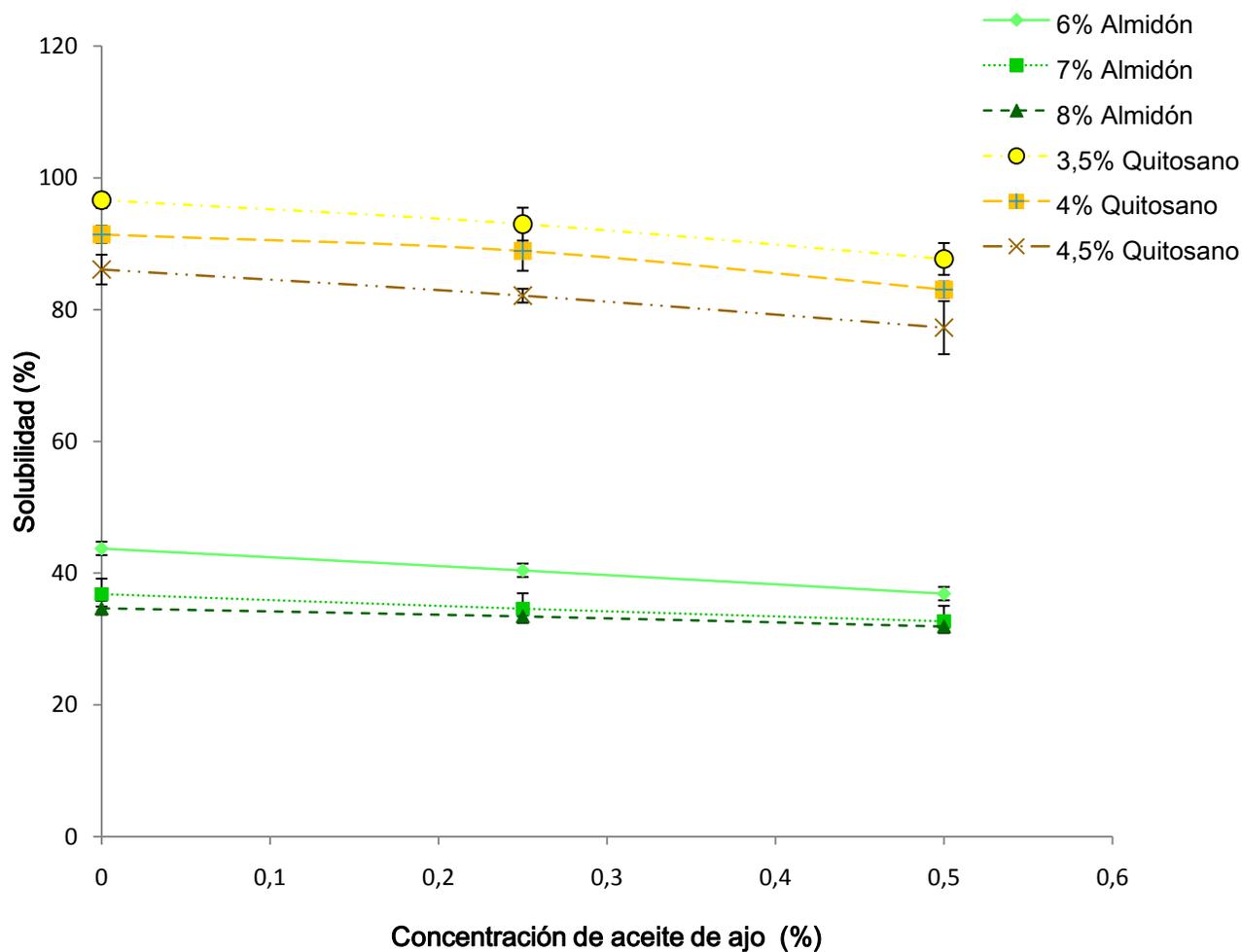
**Tabla 11.** Solubilidad en agua a temperatura ambiente (T=25°C) de películas formuladas a base de quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).

Concentración de quitosano (%)	AEO		AEA		AEO + AEA	
	Concentración (%)	Solubilidad (%)	Concentración (%)	Solubilidad (%)	Concentración (%)	Solubilidad (%)
3,5	0	96,61±0,17	0	96,61±0,17	0,5 + 0,25	86,43±0,60
	0,5	90,66±0,62	0,25	93,00±2,50	0,5 + 0,5	81,88±0,08
	1	84,36±0,44	0,5	87,71±0,42	1 + 0,25	77,98±0,41
					1 + 0,5	73,79±0,15
4	0	91,43±0,29	0	91,43±0,29	0,5 + 0,25	80,08±0,22
	0,5	85,11±0,10	0,25	88,93±0,46	0,5 + 0,5	82,48±0,65
	1	77,05±0,34	0,5	83,06±0,22	1 + 0,25	72,00±0,60
					1 + 0,5	67,52±0,62
4,5	0	86,10±2,25	0	86,10±2,25	0,5 + 0,25	74,63±0,56
	0,5	80,65±0,54	0,25	82,13±1,05	0,5 + 0,5	68,81±0,50
	1	70,20±0,65	0,5	77,30±4,03	1 + 0,25	66,00±0,15
					1 + 0,5	63,40±0,12

Cada valor de solubilidad en agua es la medida de 2 determinaciones con 2 réplicas cada una, para un total de n=4 ± desviación estándar.



**Figura 16.** Solubilidad en agua a temperatura ambiente ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ) de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino o quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (0%, 0,5% y 1%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado ( $n=4$ ).



**Figura 17.** Solubilidad en agua a temperatura ambiente ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ) de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino o quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado ( $n=4$ ).

### **4.3 Propiedad mecánica: Fuerza a la punción.**

La fuerza a la punción es una medida que podría indicar la resistencia que tiene la película al ser sometida a un estrés físico (punción), este parámetro se encuentra influenciado por la composición de las películas a evaluar, tales como la concentración del polímero, presencia de compuestos lipídicos (aceites esenciales), plastificantes (glicerol), etc. (anexos 4e y 4f).

Las películas elaboradas a base de almidón de ocumo chino y quitosano muestran la tendencia de aumento significativo de la resistencia a la punción a medida de que la concentración del polímero en la formulación es mayor. Los resultados encontrados indican que la fuerza a la punción de las películas a base de almidón aumenta significativamente cuando la película presente en su formulación mayores concentraciones del polímero, encontrándose valores que van desde 1,72N para formulaciones con 6% de almidón de ocumo chino sin aceites esenciales hasta 2,74N para formulaciones con 8% de almidón de ocumo chino sin incorporación de aceites esenciales (tabla 12 y anexo 4a).

En el caso de las películas a base de quitosano esta propiedad tubo el mismo comportamiento, encontrándose valores que van desde 0,36N para formulaciones con 3,5% de quitosano sin aceites esenciales hasta 1,65N para formulaciones con 4,5% de quitosano sin aceites esenciales (tabla 13 y anexo 4b).

Durante el proceso de secado de las soluciones que formarán la película el agua se evapora, lo que permite la formación de la red o matriz, es precisamente durante esta etapa en que la proximidad de las cadenas del polímero se ven favorecidas por el aumento del contenido del polímero, facilitando la

formación de una matriz más densa debido al aumento en las interacciones entre las moléculas del polímero (Mali y col., 2004).

Al observar los resultados obtenidos de la fuerza a la punción que presentan las películas formuladas con los biopolímeros ya mencionados, se puede apreciar que las formulaciones a base de almidón de ocumo chino son más resistentes que las películas formuladas con quitosano, esto podría deberse a que la matriz elaborada a base de ocumo chino forman una matriz más densa debida a la naturaleza y concentración del polímero empleado, promoviendo la formación de películas más fuertes con elevada resistencia a la punción (figuras 18 y 19); de ahí que, para mejorar la resistencia a la punción de las formulaciones se debería aumentar la concentración del polímero.

Otro factor que influye en la fuerza a la punción es la presencia de lípidos en las formulaciones evaluadas. La adición de lípidos reduce significativamente la resistencia a la punción debido a que su presencia en la matriz polimérica provoca debilitamiento, además induce a la lubricación (anexos 4c y 4d) (Banerjee y col., 1995). Esto explica porque para ambos tipos de películas al aumentar la concentración de compuestos lipídicos en la formulación menor fuerza a la punción ofrece, sin embargo, no existen diferencias significativas en la fuerza a la punción de películas que contenían aceite de orégano y las que presentaban aceite de ajo en las mismas concentraciones (anexos 4e y 4f).

Más aún, las películas elaboradas a base de ocumo chino y quitosano que presentan en su formulación combinaciones de aceites esenciales de orégano y ajo, a medida de que las concentraciones eran mayores, menor será la fuerza a la punción de las películas.

Esto quiere decir que si se requiere elaborar una película que presente alta fuerza a la punción, entonces debe presentar pocos compuestos lipídicos, plastificantes y se debería aumentar la concentración del polímero a emplear en la formulación. De los resultados obtenidos se puede concluir que la formulación que contiene 8% de almidón de ocumo chino sin la incorporación de aceites esenciales representa la combinación de componentes que maximiza fuerza a la punción. Por otra parte la formulación óptima de las películas a base de quitosano presenta 4,5% del polímero, sin la incorporación de aceites esenciales (anexo 4g, 4h y 7b).

Li y col. (2010) reportaron que las películas a base de quitosano puro al 1% presentaron fuerza de punción de 5,2N valor que disminuía significativamente cuando se empleaban menores proporciones de quitosano. Por otra parte, Mali y col. (2004) encontraron valores de 14,89N para películas formuladas con 4% de almidón de ñame que contenían 2% de glicerol y de 8,73N para formulaciones con 3,3% del almidón ya mencionado con las mismas concentraciones del plastificante. Estos valores difieren a los encontrados en el presente proyecto de investigación debido que estos investigadores emplean diferentes concentraciones y tipos de polímeros, plastificantes, surfactantes y compuestos lipídicos.

**Tabla 12.** Fuerza a la punción de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).

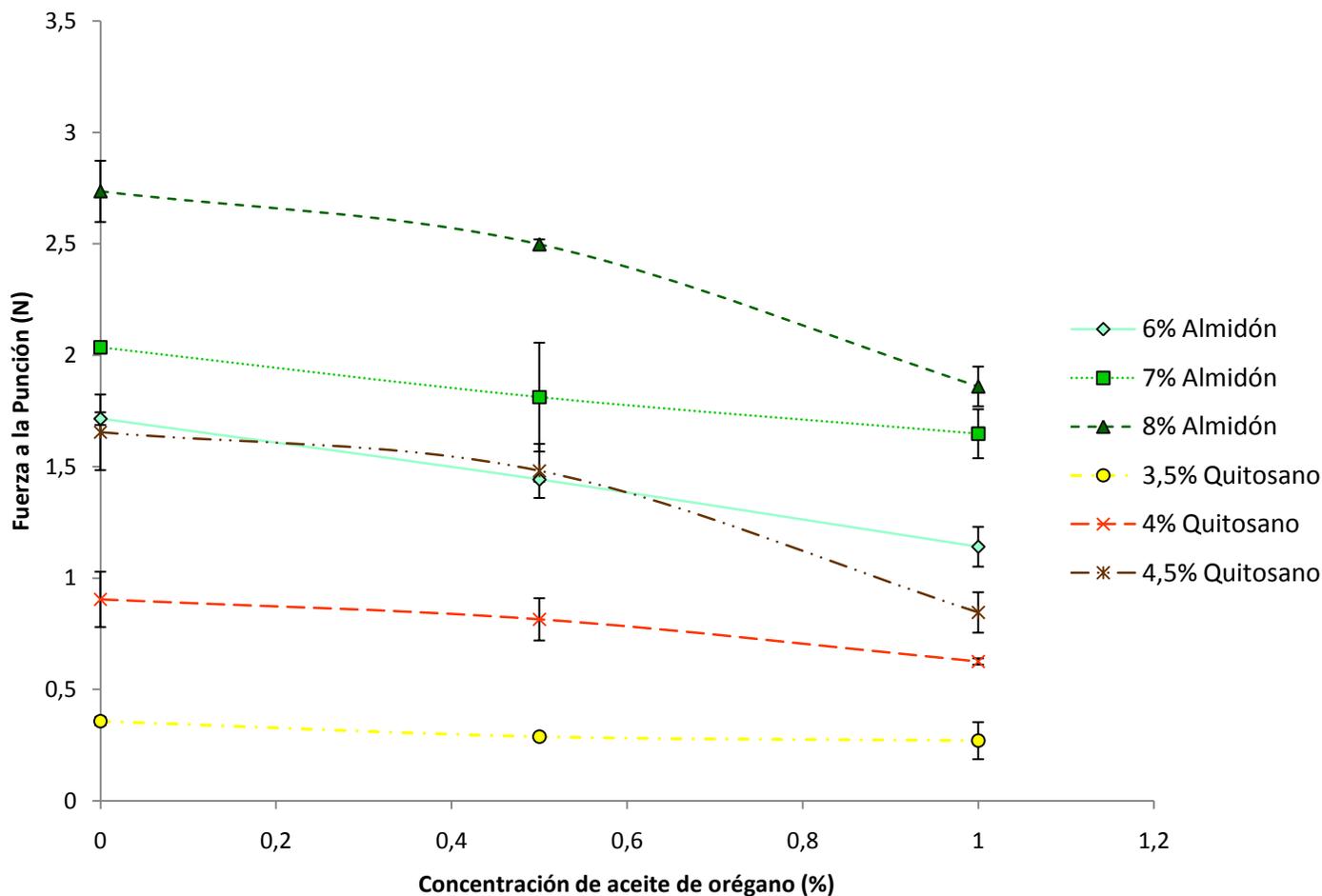
Concentración de almidón (%)	AEO		AEA		AEO + AEA	
	Concentración (%)	Punción (N)	Concentración (%)	Punción (N)	Concentración (%)	Punción (N)
6	0	1,72±0,02	0	1,72±0,02	0,5 + 0,25	1,40±0,01
	0,5	1,44±0,01	0,25	1,64±0,02	0,5 + 0,5	1,34±0,02
	1	1,14±0,01	0,5	1,43±0,01	1 + 0,25	1,00±0,03
					1 + 0,5	0,70±0,01
7	0	2,04±0,01	0	2,04±0,01	0,5 + 0,25	1,76±0,01
	0,5	1,82±0,02	0,25	1,94±0,02	0,5 + 0,5	1,70±0,02
	1	1,65±0,01	0,5	1,82±0,02	1 + 0,25	1,60±0,01
					1 + 0,5	1,46±0,04
8	0	2,74±0,01	0	2,74±0,01	0,5 + 0,25	2,44±0,05
	0,5	2,50±0,02	0,25	2,62±0,01	0,5 + 0,5	2,10±0,10
	1	1,86±0,01	0,5	2,57±0,02	1 + 0,25	1,75±0,12
					1 + 0,5	1,63±0,03

Cada valor de fuerza a la punción es la medida de 4 determinaciones con 2 réplicas cada una, para un total de  $n=8 \pm$  desviación estándar.

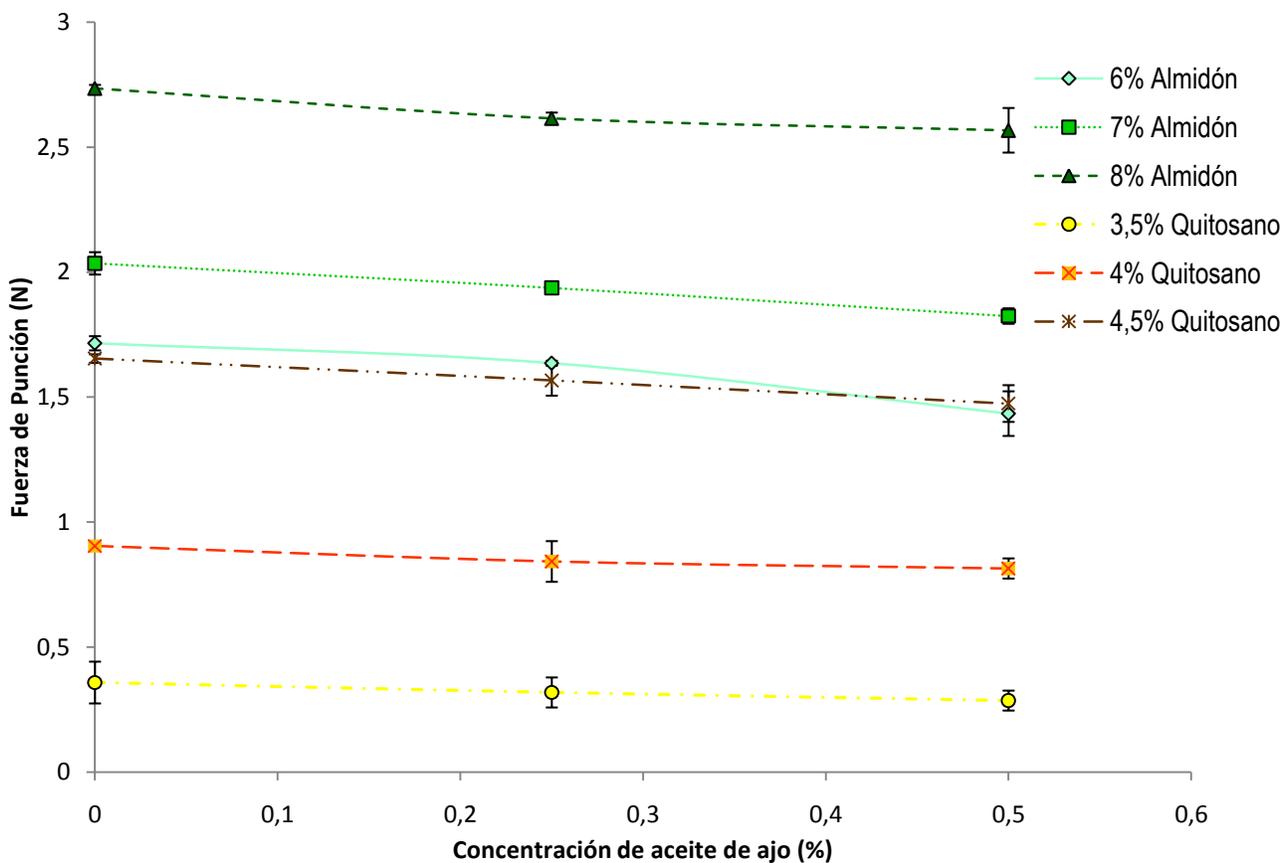
**Tabla 13.** Fuerza a la punción de películas formuladas a base de quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano (AEO) al 0%, 0,5% o 1% o aceite esencial de ajo (AEA) al 0%, 0,25% y 1% y combinaciones de ellos (AEO+AEA).

Concentración de quitosano (%)	AEO		AEA		AEO + AEA	
	Concentración (%)	Punción (N)	Concentración (%)	Punción (N)	Concentración (%)	Punción (N)
3,5	0	0,36±0,01	0	0,36±0,01	0,5 + 0,25	0,28±0,01
	0,5	0,30±0,01	0,25	0,32±0,02	0,5 + 0,5	0,27±0,02
	1	0,27±0,02	0,5	0,28±0,01	1 + 0,25	0,26±0,01
					1 + 0,5	0,25±0,03
4	0	0,90±0,01	0	0,90±0,01	0,5 + 0,25	0,76±0,01
	0,5	0,81±0,03	0,25	0,84±0,02	0,5 + 0,5	0,70±0,01
	1	0,63±0,02	0,5	0,81±0,03	1 + 0,25	0,60±0,03
					1 + 0,5	0,53±0,04
4,5	0	1,65±0,02	0	1,65±0,02	0,5 + 0,25	1,20±0,01
	0,5	1,50±0,01	0,25	1,56±0,01	0,5 + 0,5	1,00±0,02
	1	0,85±0,02	0,5	1,50±0,03	1 + 0,25	0,78±0,01
					1 + 0,5	0,72±0,02

Cada valor de fuerza a la punción es la medida de 4 determinaciones con 2 réplicas cada una, para un total de n=8 ± desviación estándar.



**Figura 18.** Fuerza a la punción de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino y quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).



**Figura 19.** Fuerza a la punción de películas formuladas a base de almidón de ocumo chino y quitosano incorporando diferentes concentraciones de aceite esencial de ajo (0%, 0,25% y 0,5%). Dos repeticiones de cada análisis fueron realizados, cada una con duplicado (n=4).

#### **4.4 Propiedad funcional: Acción antimicrobiana.**

La actividad antimicrobiana de las películas formuladas a base de almidón de ocumo chino o quitosano con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano y de ajo contra *Salmonella entérica* Serovariedad Enteritidis y *Listeria monocytogenes*, fue evaluada cuantitativamente mediante la medición del diámetro del halo de inhibición (tabla 14 y 15).

Las películas a base de almidón en diferentes concentraciones no presentaron actividad antimicrobiana sobre *S. entérica* ni *L. monocytogenes* (figura 20), indicándonos que variar la concentración de almidón no afecta significativamente el crecimiento de los microorganismos evaluados. Por el contrario, las películas a base de quitosano exhibieron actividad antibacterial significativa contra los microorganismos patógenos estudiados, observándose que a medida que la concentración de quitosano aumentaba en la formulación la actividad antimicrobiana era mayor (anexo 5a, 5b, 5c, 5d).

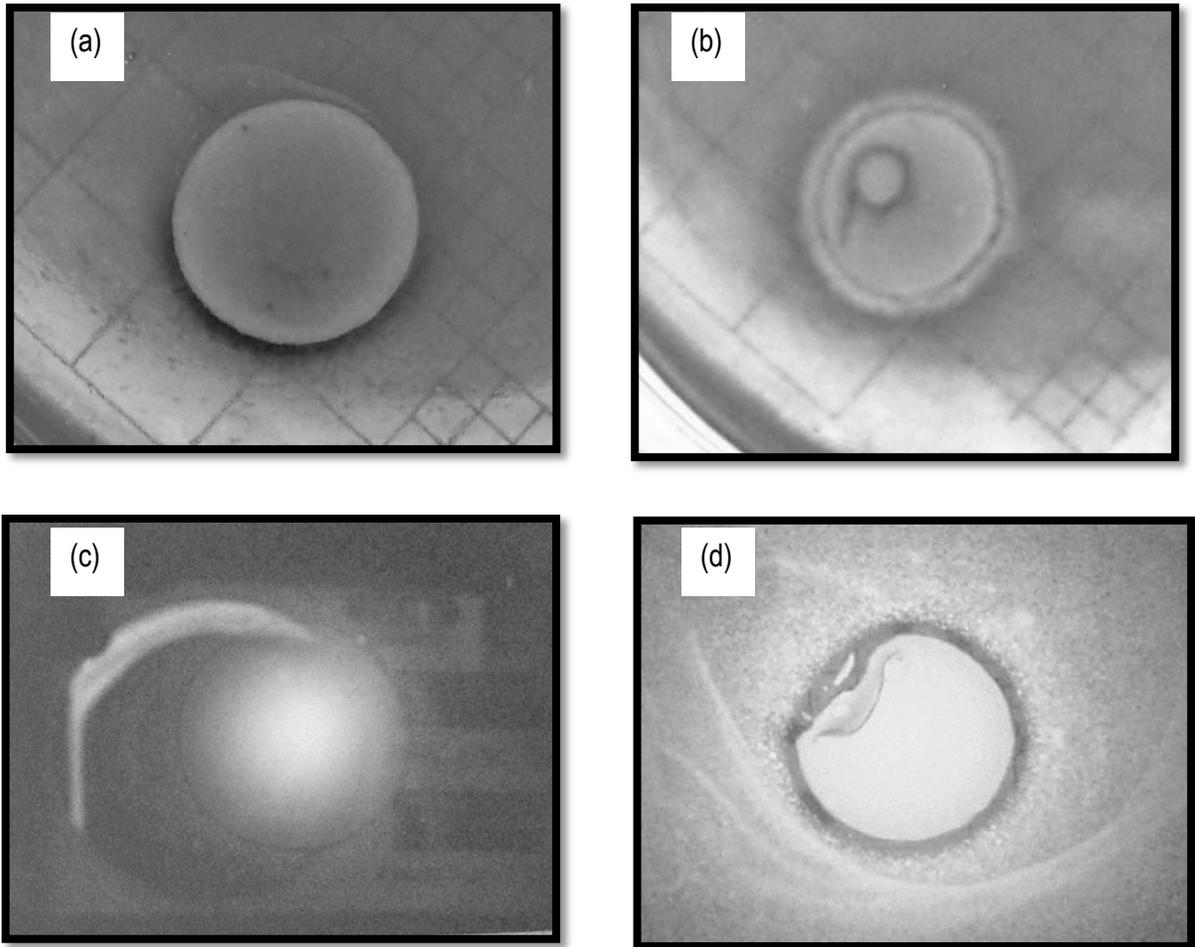
Una característica clave del quitosano es su carga positiva (grupo amino), la cual permite la creación de una estructura policatiónica que podría interactuar con los componentes aniónicos (lipopolisacáridos y proteínas) que se encuentran en la superficie de la membrana celular (Rhoades y Roller, 2000). Al aumentar la concentración de quitosano, las cadenas de moléculas policatiónicas interrumpen en mayor proporción la integridad de la pared celular trayendo como consecuencia la pérdida de la función de barrera (Helander y col., 2001).

**Tabla 14.** Actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas a base de almidón de ocumo chino, incorporando aceite esencial de orégano (AEO), aceite esencial de ajo (AEA) y combinaciones de aceites esenciales (AEO+AEA) contra *Salmonella entérica* Ser. Enteritidis y *Listeria monocytogenes*.

Concentración de almidón (%)	AEO	Zona de inhibición (mm)		AEA	Zona de inhibición (mm)		AEO + AEA	Zona de inhibición (mm)	
	Concentración (%)	<i>Salmonella entérica</i> Ser. Enteritidis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Concentración (%)	<i>Salmonella entérica</i> Ser. Enteritidis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Concentración (%)	<i>Salmonella entérica</i> Ser. Enteritidis	<i>Listeria monocytogenes</i>
6	0	0 ± 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 + 0,25	0,84 ± 0,04	1,77 ± 0,04
	0,5	0,64 ± 0,03	1,49 ± 0,02	0,25	0,20 ± 0,01	0,35 ± 0,04	0,5 + 0,5	1,00 ± 0,01	1,97 ± 0,06
	1	1,02 ± 0,02	2,96 ± 0,22	0,5	0,40 ± 0,02	0,69 ± 0,05	1 + 0,25	1,27 ± 0,03	3,37 ± 0,09
							1 + 0,5	1,40 ± 0,01	3,74 ± 0,01
7	0	0 ± 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 + 0,25	0,84 ± 0,06	1,75 ± 0,08
	0,5	0,66 ± 0,06	1,41 ± 0,14	0,25	0,25 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,5 + 0,5	1,07 ± 0,01	1,96 ± 0,02
	1	1,09 ± 0,06	3,03 ± 0,29	0,5	0,49 ± 0,01	0,67 ± 0,01	1 + 0,25	1,21 ± 0,10	3,36 ± 0,07
							1 + 0,5	1,47 ± 0,03	3,74 ± 0,16
8	0	0 ± 0	0 ± 0	0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 + 0,25	0,82 ± 0,02	1,75 ± 0,03
	0,5	0,62 ± 0,06	1,49 ± 0,07	0,25	0,24 ± 0,01	0,34 ± 0,05	0,5 + 0,5	1,26 ± 0,28	1,94 ± 0,01
	1	1,15 ± 0,01	2,97 ± 0,06	0,5	0,47 ± 0,01	0,64 ± 0,02	1 + 0,25	1,23 ± 0,06	3,45 ± 0,19
							1 + 0,5	1,45 ± 0,02	3,83 ± 0,08

**Tabla 15.** Actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas a base de quitosano, incorporando aceite esencial de orégano (AEO), aceite esencial de ajo (AEA) y combinaciones de aceites esenciales (AEO+AEA) contra *Salmonella entérica* Ser. Enteritidis y *Listeria monocytogenes*.

Concentración de quitosano (%)	AEO	Zona de inhibición (mm)		AEA	Zona de inhibición (mm)		AEO + AEA	Zona de inhibición (mm)	
	Concentración (%)	<i>Salmonella</i> <i>entérica</i> Ser. Enteritidis	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Concentración (%)	<i>Salmonella</i> <i>entérica</i> Ser. Enteritidis	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Concentración (%)	<i>Salmonella</i> <i>entérica</i> Ser. Enteritidis	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
3,5	0	0,36±0,003	0,73±0,01	0	0,36±0,003	0,73±0,01	0,5 + 0,25	1,15±0,02	2,50±0,01
	0,5	0,94±0,001	1,52±0,01	0,25	0,53±0,01	0,93±0,03	0,5 + 0,5	1,58±0,01	3,40±0,22
	1	1,51±0,01	3,24±0,10	0,5	1,00±0,01	1,00±0,01	1 + 0,25 1 + 0,5	1,64±0,03 1,86±0,02	3,51±0,03 4,00±0,01
4	0	0,60±0,01	0,94±0,01	0	0,60±0,01	0,94±0,01	0,5 + 0,25	1,50±0,03	2,83±0,01
	0,5	1,13±0,02	1,83±0,03	0,25	0,64±0,02	1,11±0,02	0,5 + 0,5	1,64±0,01	3,54±0,02
	1	1,60±0,02	3,53±0,01	0,5	1,00±0,01	1,70±0,01	1 + 0,25 1 + 0,5	1,82±0,02 2,01±0,01	3,80±0,01 4,14±0,03
4,5	0	0,84±0,03	1,30±0,01	0	0,84±0,03	1,30±0,01	0,5 + 0,25	1,64±0,03	3,14±0,03
	0,5	1,54±0,04	2,10±0,10	0,25	1,00±0,02	1,54±0,01	0,5 + 0,5	2,00±0,01	3,74±0,01
	1	1,72±0,01	3,63±0,10	0,5	1,34±0,05	1,93±0,01	1 + 0,25 1 + 0,5	2,13±0,02 2,40±0,10	4,00±0,03 4,34±0,02



**Figura 20.** Fotografías de discos de películas antimicrobianas comestibles a base de almidón de ocumo chino (a y c) y quitosano (b y d) sobre placas de agar inoculadas con *S. entérica* (a y b) y *L. monocytogenes* (c y d).

Los componentes activos del quitosano (polímeros alifáticos y catiónicos) provocan un debilitamiento en la superficie de las membranas bacterianas, sensibilizando al microorganismo a la lisis celular, así como también facilita la entrada de los agentes antimicrobianos (Helander y col., 2001), esto podría explicar porque las películas a base de quitosano revelan mayor acción antimicrobiana que las películas elaboradas a base de almidón cuando se incorporan a sus formulaciones las mismas concentraciones de aceites esenciales. Por consiguiente, se encontraron zonas de inhibición de 0,20 y 0,35mm de películas a base de almidón de ocumo chino al 6% incorporando 0,25% de aceite esencial de ajo y 0,53 y 0,93mm de películas a base de quitosano al 3,5% que contenían 0,25% de aceite de ajo para *S. entérica* y *L. monocytogenes* respectivamente (tabla 14 y 15).

La incorporación de aceites esenciales en las películas a base de almidón le suministró actividad antimicrobiana a las mismas. Así mismo, en el caso de las películas a base de quitosano la adición de aceites esenciales aumentó significativamente la actividad antimicrobiana siendo esta cada vez mayor a medida que incrementaba la concentración de aceite esencial. (Tablas 14 y 15 y anexos 5a, 5b, 5c y 5d).

Las películas a base de almidón de ocumo chino que contenían 0,25% de aceite de ajo tuvieron poco efecto contra los microorganismos evaluados, provocando una zona de inhibición de 0,2 y 0,3mm para *S. entérica* y *L. monocytogenes* respectivamente, zona que aumentó significativamente a medida que la película probada presentaba mayor contenido de aceite de ajo, siendo de 0,4 y 0,6mm para *S. entérica* y *L. monocytogenes* las zonas de inhibición provocadas por películas que contenían 0,5% de aceite esencial de ajo (figura 21). La misma tendencia se encuentra para las formulaciones elaboradas a base de quitosano, observándose el menor efecto antimicrobiano sobre *S. entérica* y *L. monocytogenes* en la formulación que incluía 0,25% aceite de ajo la cual provocó zonas de inhibición de

0,36 y 0,73mm respectivamente, y aumentó a medida de que se empleaba mayores concentraciones del mismo aceite esencial.

Del mismo modo, se obtuvieron zonas de inhibición de 0,6mm para *S. entérica* y 1,4mm para *L. monocytogenes* de películas a base de almidón de ocumo chino con 0,5% de aceite de orégano, zona que incrementó a 1,2mm para *S. entérica* y 2,9mm para *L. monocytogenes* cuando se evaluaron películas contiendo 1% de aceite de orégano. Y para las formulaciones a base de quitosano con 0,5% aceite de orégano se registraron zonas de inhibición para *S. entérica* y *L. monocytogenes* de 0,94mm y 1,52mm respectivamente, la cual aumentó a 1,51mm y 3,24mm cuando la película en cuestión contenía 1% de aceite de orégano (figura 22).

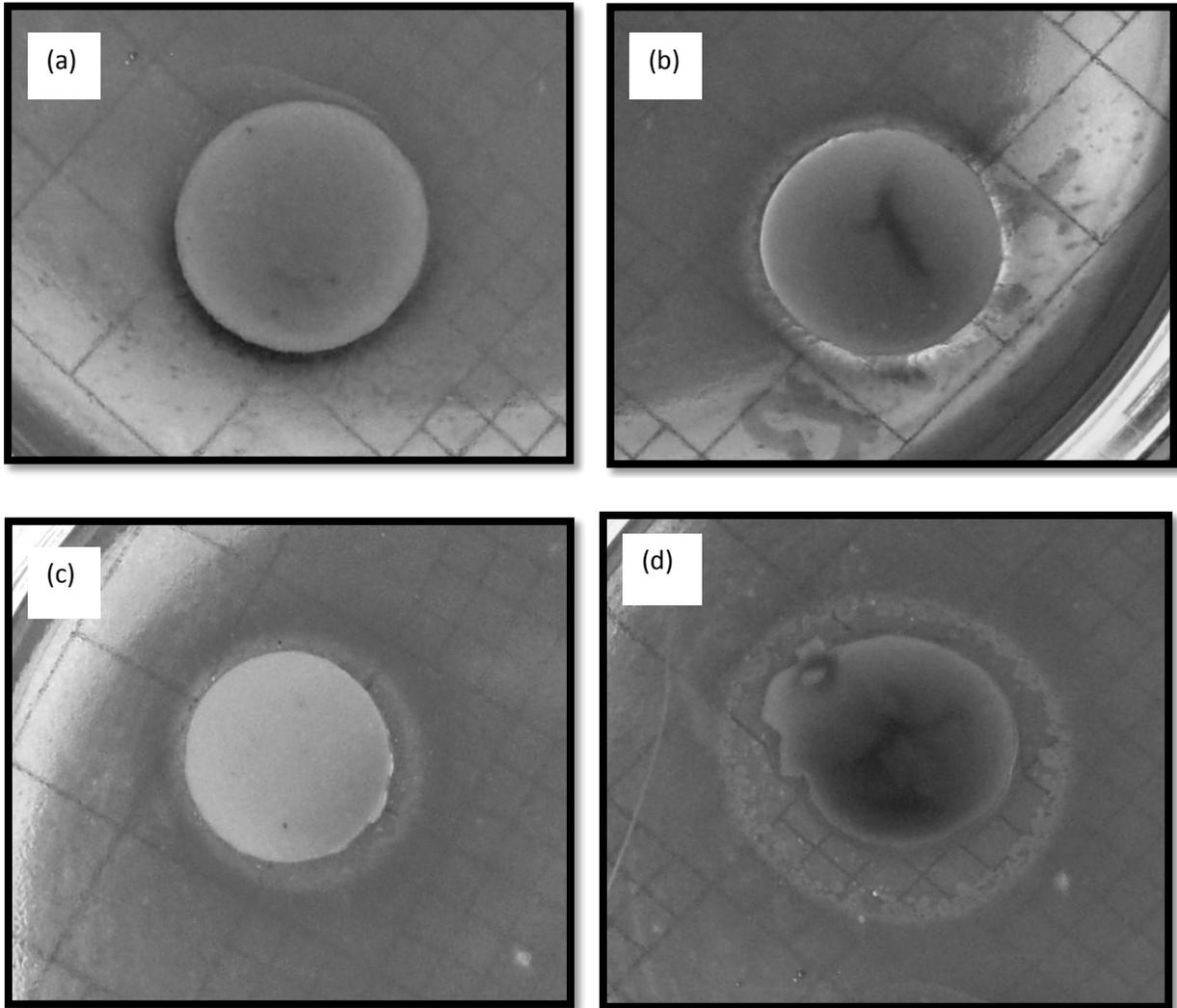
La actividad antimicrobiana debida a la incorporación de aceite esencial de orégano fue mayor que la observada cuando aceite esencial de ajo fue añadido tanto para las formulaciones elaboradas a base de almidón de ocumo chino como para las de quitosano. Al evaluar el efecto antimicrobiano de películas a base de almidón de ocumo chino que contenían 0,5% de aceite de orégano o 0,5% de aceite de ajo se obtuvieron zonas de inhibición de 0,66mm y 0,49mm para *S. entérica* y 3,63mm y 1,93mm para *L. monocytogenes* respectivamente. Además, para las películas a base de quitosano al 4,5% con 0,5% de aceite de orégano, se obtuvieron zonas de inhibición de 1,72mm para *S. entérica* y de 3,63mm y para *L. monocytogenes*, valores que son superiores a los encontrados cuando se incorporó 0,5% de aceite esencial de ajo al mismo tipo de películas, siendo estos de 1,34mm y 1,93mm para *S. entérica* y *L. monocytogenes* respectivamente.

Asimismo, al evaluar el efecto antimicrobiano provocado por las películas a base de almidón de ocumo chino y quitosano con la incorporación de combinaciones de aceites esenciales de orégano y

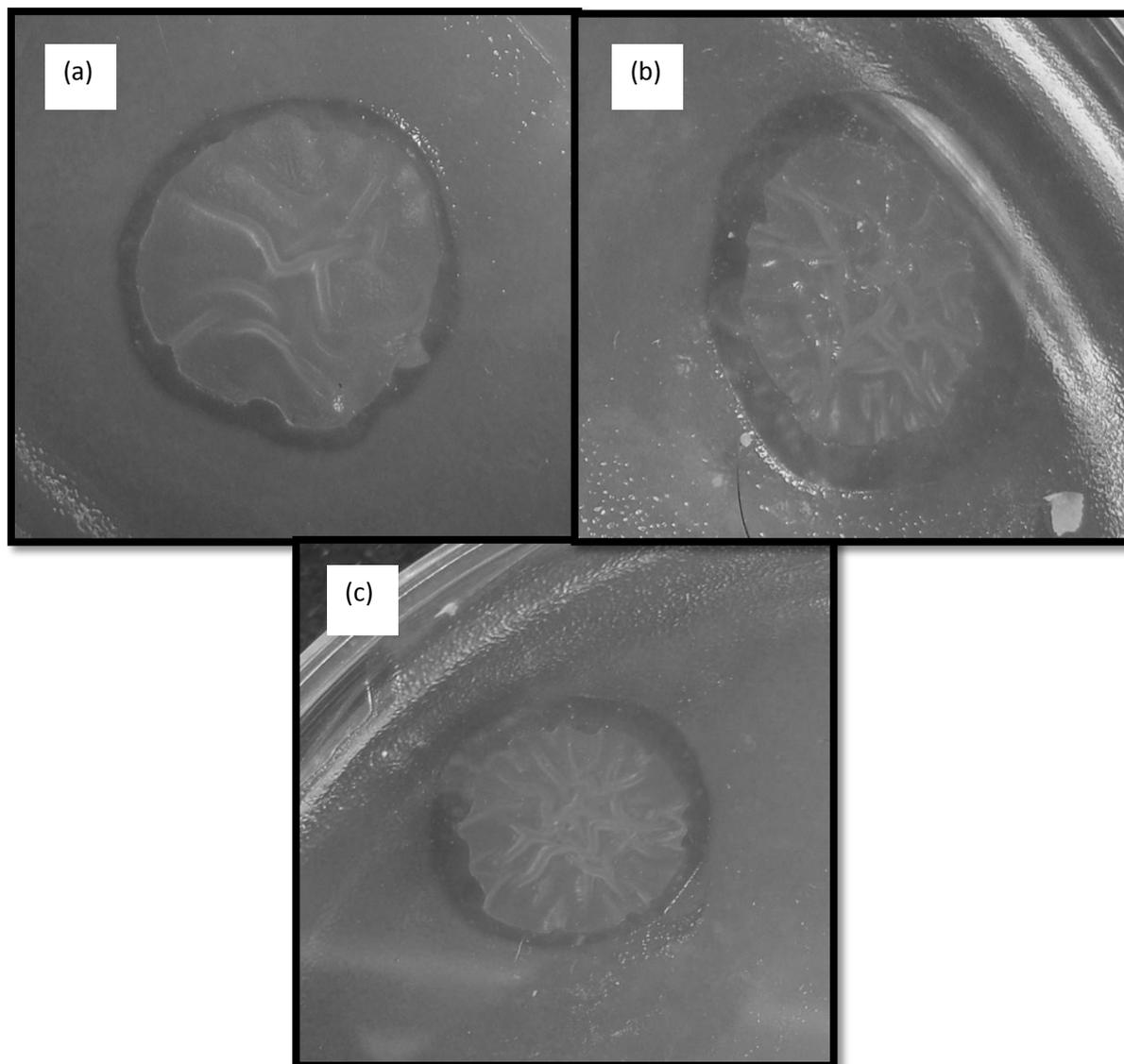
ajo, se tiene un mayor efecto a medida que las concentraciones empleadas en la formulación son mayores (tabla 14 y 15 y figura 21 y 22).

Según Oussalah y col. (2006). La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano es debida a su alta concentración de compuestos fenólicos como el timol y su isómero el carvacrol (figura 23), los cuales según Seydim y Sarikus (2006) causan un aumento en la permeabilidad de la membrana celular ocasionando la liberación del contenido citoplasmático y disminución de la producción de ATP y del pH intracelular.

Diferentes investigadores reportan la acción antimicrobiana del aceite esencial de orégano contra una amplia gama de microorganismos. Oussalah y col. (2006) reportaron que la adición de 1% de aceite de orégano redujo significativamente el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 en productos cárnicos. Por otra parte, Sahin y col. (2004) reportaron que el aceite esencial de orégano tubo efecto contra una amplia gama de microorganismos, entre los que se puede mencionar levaduras, mohos (*Aspergillus flavus*, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rizopus* spp.) y bacterias (*Acinetobacter baumannii*, *Basillus* spp., *Enterobacter faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp.). Así mismo, Rojas y col. (2006) reportaron zonas de inhibición de 1,4mm de diámetro para *E. coli* O157:H7 cuando evaluaron películas a base de alginato y puré de manzana incorporando 1% de aceite esencial de orégano.



**Figura 21.** Fotografías de discos de películas antimicrobianas comestibles a base de almidón de ocumo chino sin aceites esenciales (a), con 0,25% de aceite esencial de ajo (b), con 0,5% de aceite esencial de ajo (c) y 1% de aceite de orégano + 0,25% de aceite de ajo (c) sobre placas de agar inoculadas con *S. entérica*.



**Figura 22.** Fotografías de discos de películas antimicrobianas comestibles a base de quitosano al 3,5% con 0,5% aceite de orégano (a), 1% de aceite de orégano (b) y 0,5% aceite de orégano + 0,25% de aceite esencial de ajo (c) sobre placas de agar inoculadas con *L. monocytogenes*.

Según Pranoto y col. (2005) los principales componentes del aceite de ajo son disulfuro dialilo (60%), trisulfuro dialilo (20%), propil disulfuro de alilo (16%) y una pequeña cantidad de disulfuro y polisulfuro dialilo, siendo el disulfuro de dialilo “alicina” el principal responsable de la acción antimicrobiana, la cual al oxidarse causa la inactivación de enzimas y subsecuentemente inhibición del crecimiento microbiano (figura 23) (Arora y Kaur. 1999).

La acción antimicrobiana del aceite esencial de ajo contra una amplia gama de microorganismos, ha sido reportada por diversos investigadores. Pranoto y col. (2005) reportaron que la incorporación de 0,1% de aceite ajo a películas a base de alginato resultaron efectivas contra *E. coli*, *S. typhimutium*, *S. aureus* y *Bacillus cereus*, además Arora y Kaur (1999) reportaron acción antimicrobiana del aceite de ajo contra microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*.

Tanto el carvacrol como la alicina son los responsables de la acción antimicrobiana atribuida a los aceites esenciales (orégano y ajo respectivamente), sin embargo sus coeficientes de partición hace que fluyan de manera diferencial en la membrana bacteriana, esto explica las diferencias encontradas entre la acción antimicrobiana del aceite esencial de orégano y de ajo.

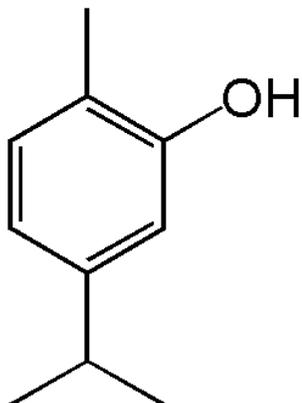
El coeficiente de partición ( $k$ ) mide la solubilidad diferencial de una sustancia en dos fases de una mezcla formada por dos solventes inmiscibles (Leo y col., 1971), por lo tanto a mayores valores de coeficiente de partición muestra mayor solubilidad en lípido y por tanto mayor velocidad de difusión en la membrana citoplasmática (Xia y col., 2005). El coeficiente de partición del carvacrol y de la alicina es 3,4 y 1,95 respectivamente (Montolla y col., 2007 y Quiminet, 2010), esto indica que la velocidad de

desplazamiento del carvacrol a través de la membrana lipídica es mayor que la difusión de la alicina y por ende su acción como sustancia antimicrobiana será mayor.

Aun cuando ambos aceites esenciales (orégano y ajo) mostraron una acción antimicrobiana contra los dos microorganismos patógenos evaluados *S. entérica* y *L. monocytogenes* se observó que la magnitud del efecto antimicrobiano fue diferente, siendo mayor sobre *L. monocytogenes* (tabla 14 y 15). Esto puede ser explicado por el hecho de que se trata de un microorganismo Gram positivo, los cuales se caracterizan por presentar una capa de peptidoglicano y una membrana interna, mientras que *Salmonella* es un microorganismo Gram negativo, los cuales se caracterizan por tener una membrana externa, una capa de peptidoglicano más delgada y una membrana interna, lo que dificulta en mayor proporción, el paso de los compuestos antimicrobianos. Un comportamiento similar fue reportado por Pranoto y col (2005) y Seydim y Sarikus (2006), quienes indicaron que la acción antimicrobiana de aceites esenciales fue mayor en bacterias Gram positivas que en las Gram negativas.

Tomando como base los resultados obtenidos, se puede inferir que la formulación a base de almidón que presenta óptimas propiedades antimicrobianas se compone de 8% de almidón, 1% de aceite de orégano y 0,5% de aceite de ajo, mientras que la formulación a base de quitosano al 4,5% a la que fue incorporado 1% de aceite de orégano y 0,5% aceite de ajo presentaron los valores más altos de actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados (anexos 5e, 5f, 5g y 5h y 7c).

(a)

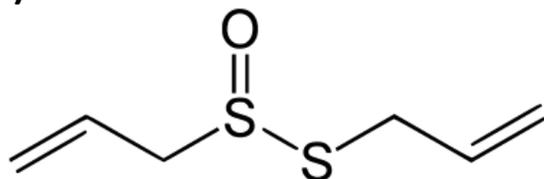


Nombre común: Carvacrol

Nombre sistémico: 5-isopropil-2-metilfenol

Fórmula química:  $C_{10}H_{14}O$

(b)



Nombre común: Alicina

Nombre sistemático: S-Alil-2-propentiosulfinato

Fórmula química:  $C_6H_{10}OS_2$

**Figura 23.** Estructura molecular, nombre sistémico (IUPAC) y fórmula química de los componentes antimicrobianos principales aceites esenciales (a) carvacrol y (b) alicina. Tomado de: [www.aromaticplantproject.com/images/carvacrol](http://www.aromaticplantproject.com/images/carvacrol) y [http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos\\_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm](http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm)

### **FASE 5. Aplicación del diseño experimental para determinar la formulación ideal.**

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación demuestran que la concentración del polímero (almidón o quitosano) y de aceites esenciales (orégano y/o ajo) intervienen significativamente en las propiedades de barrera, estructurales, mecánicas y funcionales de las películas formuladas, sin embargo el aumento en la concentración de estos constituyentes no trae respuestas directamente proporcionales para todas las propiedades evaluadas.

Las formulaciones que presentan altas concentraciones de aceites esenciales se caracterizarán por tener una baja permeabilidad al vapor de agua, baja solubilidad, alta acción antimicrobiana pero baja fuerza a la punción; esto quiere decir que con el empleo de estas concentraciones de compuestos lipídicos no necesariamente se logra formular una película con propiedades óptimas. En el caso de los polímeros, el aumento en la concentración de almidón trae resultados satisfactorios para la solubilidad en agua y para la fuerza a la punción, pero no para la permeabilidad al vapor de agua; por otra parte el aumento de quitosano en las formulaciones trae resultados positivos para todas las propiedades evaluadas.

Con la finalidad de establecer la combinación de factores apropiados que maximizan las propiedades de las películas antimicrobianas comestibles evaluadas, se realizó un diseño experimental para las elaboradas a base de almidón de ocumo chino (anexo 6a) y de quitosano (anexo 6b), obteniéndose que para las películas a base de almidón la formulación óptima corresponde a la elaborada con 7% del polímero incorporando de 0,5% aceite de orégano y 0,25% aceite de ajo. En lo que respecta a las formulaciones a base de quitosano, las elaboradas con 4,485% del polímero, 0,82% aceite de orégano y 0,5% aceite de ajo corresponde a la formulación que exhibirá las mejores propiedades.

## CONCLUSIONES

- ✓ Los procesos de extracción de almidón de tubérculos de ocumo chino y de quitosano a partir de conchas de camarones tuvieron resultados positivos, obteniéndose la materia prima en buenas condiciones para elaborar las películas comestibles.
- ✓ La PVA de las películas estudiadas en el presente proyecto se encontró afectada significativamente por los polímeros empleados en la formulación, aumentando la tasa de transferencia de vapor a medida de que la concentración de almidón en la formulación era mayor y disminuyendo cuando la concentración de quitosano aumentaba. Esta propiedad también fue influenciada por la presencia de compuestos lipídicos en la formulación, siendo el comportamiento general de aumento a medida de que la concentración de lípidos era mayor, además el empleo de aceite de orégano disminuyó en mayor proporción que cuando se emplearon las mismas concentraciones de aceite de ajo.
- ✓ La solubilidad en agua a temperatura ambiente de las películas estudiadas se encontró regida por la concentración de los polímeros y aceites esenciales a emplear en su formulación. A medida de que la concentración de almidón o quitosano era mayor en la formulación, la capacidad de mantener la integridad en el ambiente acuoso aumentaba de la misma manera que cuando la concentración de componentes lipídicos en la formulación era mayor.
- ✓ La fuerza de la punción de las películas formuladas fue otra propiedad evaluada, encontrándose mayores módulos de fuerza a medida de que la concentración de los polímeros (almidón o quitosano) aumentaba y la concentración de lípidos disminuía.

- ✓ La presencia de compuestos bactericidas definió las actividades antimicrobianas contra *L. monocytogenes* y *S. entérica* que presentaron las películas evaluadas. Estos compuestos fueron los aceites esenciales (orégano y ajo), los cuales provocaban mayor acción antimicrobiana a medida de que sus concentraciones eran mayores.
- ✓ Los polímeros también pueden aportar actividades antimicrobianas, en este proyecto se encontró que al aumentar la concentración de quitosano mayor era la actividad antimicrobiana, a diferencia del almidón el cuál no presentó actividad antimicrobiana.
- ✓ La acción antimicrobiana debida a la incorporación de aceite de orégano en las formulaciones fue mayor que cuando se incorporaron las mismas concentraciones de aceite de ajo.
- ✓ La acción antimicrobiana debida a la incorporación de aceite esencial de orégano y/o ajo a las películas evaluadas provocaron un efecto más prominente en *L. monocytogenes* que en *S. entérica* debido a sus características Gram.
- ✓ La combinación de factores apropiados que maximizan las propiedades de las películas antimicrobianas comestibles a base de almidón evaluadas corresponde a la elaborada con 7% del polímero incorporando de 0,5% aceite de orégano y 0,25% aceite de ajo, por lo tanto esta será lo formulación que tendrá mejores propiedades de PVA, solubilidad en agua a temperatura ambiente, fuerza a la punción y actividad antimicrobiana contra *S. entérica* y *L. monocytogenes*.
- ✓ En lo que respecta a las formulaciones a base de quitosano, la película antimicrobiana elaborada con 4,485% del polímero, 0,82% aceite de orégano y 0,5% aceite de ajo corresponde a la formulación que exhibirá las mejores propiedades de barrera, estructural, mecánica y funcional.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Se sugiere determinar el peso molecular del quitosano extraído de conchas de camarones (*P. vannamei*) por medio de la técnica de viscosimetría capilar propuesta por Parada y col. (2004).
- ✓ Para obtener mayor grado de desacetilación y por lo tanto aprovechar en mayor proporción el quitosano extraído de concha de camarones, se recomienda emplear métodos químicos más drásticos.
- ✓ Se recomienda evaluar la efectividad de la incorporación de N-vinil-2-pirrolidona u óxido de polietileno para mejorar las características de las películas formuladas a base de quitosano ya que disminuyen la coloración amarillenta y mejoran sus propiedades de barrera (PVA) y antimicrobianas.
- ✓ Se sugiere evaluar los beneficios de la aplicación de las películas a base de almidón y quitosano que resultaron óptimas sobre productos alimenticios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. A.A.C.C., American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Ed. American Association of Cereal Chemist, St. Paul Minn. U.S.A.
2. A.A.C.C., American Association of Cereal Chemists. 2003. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Ed. American Association of Cereal Chemist, St. Paul Minn. U.S.A.
3. Aboubakar, N., Njintang, J., Carl, M. 2009. Texture, microstructure and physicochemical characteristics of taro (*Colocasia esculenta*) as influenced by cooking conditions. *J Food Eng.* **9**: 373 – 379.
4. Al-Sagheer, F., Al-Sughayer, M., Muslim, S., Elsabee, M. 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydr Polym.* **77**: 410 – 419.
5. Almasi, H., Ghanbarzadeh, B., Entezami, A. 2010. Physicochemical properties of starch-CMC-nanoclay biodegradable films. *Int J Biol Macromol.* **46**: 1 – 5.
6. Anuario Estadístico Agropecuario 1989-90-91, República de Venezuela, Ministerio de Agricultura y Cría, Dirección General Sectorial de la Oficina de Planificación del Sector Agropecuario. Dirección de estadística. Caracas, 1994.
7. Anuario Estadístico Agropecuario 1970, República de Venezuela, Ministerio de Agricultura y Cría, Dirección General Sectorial de la Oficina de Planificación del Sector Agropecuario. Dirección de estadística. Caracas, 1971.
8. Anuario Estadístico Agropecuario 1980, República de Venezuela, Ministerio de Agricultura y Cría, Dirección General Sectorial de la Oficina de Planificación del Sector Agropecuario. Dirección de estadística. Caracas, 1984.
9. A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists. 2002. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

10. Arora, D., Kaur, J. Antimicrobial activity of spices. *Antimicrob agents*. **12**: 257-262
11. Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turk, M. 1996. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol*. **45**: 439 – 496.
12. Banerjee, R. Chen, H. Functional properties of edible films using whey protein concentrate. 1995. *N Dairy Food Res C*. **78**: 1673 – 1683.
13. Bégin, A., Van Calsteren M. 1999. Antimicrobial films produced from chitosan. *Int J Biol Macromol*. **26**: 63 – 67.
14. Bertuzzi, M., Armada, M., Gottifredi, J. 2007. Physicochemical characterization of starch based films. *J Food Eng*. **82**: 17 – 25.
15. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. **94 (3)**: 223-253
16. Brown, T., LeMay, H., Bursten, B., Burdge, J. 2004. Química la ciencia central. Editorial PEARSON Prentice Hall. Novena edición. México. Pág 901.
17. Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot*. **67 (4)**: 833-848.
18. Cha, D., Chinnan, M. 2004. Biopolymer - based antimicrobial packaging: a review. *Crc Cr Rev Food Sci*. **44 (4)**: 223 – 327.
19. Chien, P., Sheu, F., Yang, F. 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *J Food Eng*. **78**: 225 – 229.
20. Coma, V. 2008. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci*. **78**: 90 – 103.

21. Delahaye, P., Pino, E., Parra, J., Herrera, A. 2006. Características físicas y nutricionales de extruidos de plátano verde (*Musa spp*), ocumo chino (*Colocasia esculenta*) y maíz (*Zea mays L.*). *Acta Científica Venezolana*. **57 (4)**: 144 – 148.
22. Gennadios, A., Hanna, M., Kurth, L. 1997. Application of edible coatings on meats, Poultry and Seafoods: A Review. *Lebensm Wiss Technol*. **30**: 337 – 350.
23. Helander, I., Nurmiäho, E., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Microbiol*. **71**: 235 – 244.
24. INN, Instituto Nacional de Nutrición. 1999. Tabla de composición de alimentos para uso práctico. Instituto Nacional de Nutrición, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, M.S.A.S., Venezuela.
25. Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. 1971. Partition coefficients and their uses. *Chemic Rew*. **71 (6)**: 525 – 616.
26. Li, J., Zivanovic, S., Davidson, P., Kit, K. 2010. Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. *Carbohydr Polym*. **79**: 786 – 791.
27. Mali, S., Grossmann, V., García, M., Martino M., Zaritzky, N. 2004. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydr Polym*. **56**: 129 – 135.
28. Maizura, M., Fazilah, M., Norziah, M., Karim, A. 2007. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyze sago starch – alginate edible film containing lemongrass oil. *J Food Sci*. **72 (6)**: 324 – 330.
29. Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J., Rincón, M. 2006. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias*. **4 (2)**: 1 – 10.
30. Mehyar, G., Han, J. 2004. Physical and mechanical properties of high-amilose rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. *J Food Sc*. **69 (9)**: 449 - 454.

31. Mockute, D., Bernotiene, G., Judzentiene, A. 2001. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Photochem.* **57**: 65 - 69.
32. Montoya, G., Londoño, J., Yassin, L., Vásquez, G., Rojas, M., Ramírez, R. 2007. Monotérpenos aromáticos timol y carvacrol: aproximaciones de su posible papel en procesos claves de la patología cardiovascular. *Scientia Et Technica.* **13**: 27-32
33. Nwokocha, L., Aviara, N., Senan, C., Williams, P. 2009. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. *Carbohydr Polym.* **76**: 362 – 367.
34. Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacronix, M. 2006. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Food Prot.* **69 (10)**: 2364-2369.
35. Parada, L., Crespín, G., Miranda, R., Katime, I. 2004. Caracterización del Quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Rev Iberoamericana pol.* **5 (1)**: 1 -16.
36. Pranoto, Y., Salokhe, V., Raskshit, S. 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Res Int.* **38**: 267 - 272.
37. Pérez, E., Bahnassey, Y., Breene, W. 1993. A simple laboratory scale method for isolation of Amaranth starch. *VCH.* **45 (6)**: 211 – 214.
38. Pérez, E., Schultz, F., Pacheco, E. 2005. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (*tannia*) and *Colocassia esculenta* (*taro*). *Carbohydr Polym.* **60**: 139 – 145.
39. Pinotti, A., García, M., Martino, M., Zaritzky, N. 2007. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydroc.* **21**: 66 – 72.

40. Raybaudi, R., Mosqueda, J., Soliva, R., Martín, O. 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh – cut fruits and fruits juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *CRFSFS*. **8**: 157 – 180.
41. Rianudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. **31**: 603 – 632.
42. Rhoades, J., Roller, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organism in laboratory media and foods. 1999. *Am Soc Microbiol*. 80 – 86.
43. Rojas, M., Avena, R., Friedman, M., Henika, P., Martín, O., McHugh, T. 2006. Mechanical, barrier and antimicrobial properties of apple puree films containing plant essential oils. *J Agric Food Chem*. **54**: 9262 – 9267.
44. Rojas, M., Avena, R., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P., Martín, O., Pan, Z y colaboradores. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *J Food Eng*. **81**: 634 – 641.
45. Romero, C., Bello, L., García, M., Martino, M., Solorza, J., Zaritzky, N. 2005. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydr Polym*. **60**: 235 – 244.
46. Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Antolia region of Turkey. *Food Control*. **15**: 549 - 557.
47. Sangsuwan, J., Rattanapanone, N., Rachtanapun, P. 2008. Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cantaloupe and pineapple. *Postharvest Biol Tec*. 1 – 8.
48. Seydim, A., Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oil. *Food Res Int*. **39**: 639 – 644.

49. Souza, E., Stamford, T., Lima, E., Trajano, V. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*. **18**: 409 – 413.
50. Srinivasa, P., Ramesh, M., Tharanathan, R. 2006. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydroc*. **21**: 1113 – 1122.
51. Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J Food Sc*. **68 (2)**: 408 – 420.
52. Tapia, M., Rojas, M., Rodríguez F., Ramírez, J., Carmona, A., Martín, O. 2007. Alginate – and gellan -based edible films for probiotic coatings on fresh - cut fruits. *J Food Sci*. **72 (4)**: 190 - 196.
53. Xia, X., Baynes, R., Monteiro, N., Riviere, J. 2005. Determination of the partition coefficients and absorption kinetic parameters of chemicals in a lipophilic membrane/water system by using a membrane-coated fiber technique. *Eur J Pharm Sci*. **24 (1)**: 15 – 23.
54. Xu, Y., Kim, K., Hanna, M., Nag, D. 2005. Chitosan – starch composite film: preparation and characterization. *Ind Crop Prod*. **21**: 185 – 192.
55. Yin, M., Cheng, W. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Sci*. **63**: 23 – 28.

#### CONSULTAS EN LÍNEA:

56. Briceño, H., García, L., Sangronis C., Buonocore, R. 2006. Abundancia de postlarvas y juveniles de camarones en la costa sureste del Golfo de Venezuela. [En línea]. Universidad del Zulia. Bol. Centro Invest. Biol. **40 (3)**: 273-290. [Citado 10 de Marzo de 2010]. Disponible en: <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/bcib/article/viewFile/3294/3179>.

57. FAO. © 2006-2010a. - . Programa de información de especies acuáticas. **Texto por Briggs, M.** In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. [En línea]. Roma. [Citado 01 de Abril de 2010]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es).
58. FAO. © 2006-2010b. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Venezuela (República Bolivariana de Venezuela). National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. **Texto por Parra, L.** In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. [En línea]. Roma. [Citado 04 de Abril de 2010]. [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_venezuela/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_venezuela/es).
59. INSOPESCA. Rubro Crustáceos. [En línea]. Venezuela. [Citado 01 de Abril de 2010]. Disponible en: [http://www.insopesca.gob.ve/index.php?option=com\\_content&view=article&id=562:crustaceos&catid=42:informacionacuicultura&Itemid=129](http://www.insopesca.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=562:crustaceos&catid=42:informacionacuicultura&Itemid=129).
60. Montaldo, A., Mantilla, J., Zambrano, C., Zárraga, P. 2005. Agrotendencia Noticias. [En línea]. [Citado 22 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://agrotendencia.com/noticia.php?cod=193>
61. Quiminet.com. Propiedades físicas del 2-metifenol. [En línea]. [Citado 07 de junio de 2010]. Disponible en: [http://pr54.quiminet.com/2-Metilfenol.htm#t\\_pest\\_pro\\_f](http://pr54.quiminet.com/2-Metilfenol.htm#t_pest_pro_f)
62. Velásquez, C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. Avances en química. **1 (2):** 15 – 21. . [En línea]. [Citado 06 de octubre de 2009]. Disponible en: <http://www.saber.u la.ve/bitstream/123456789/18309/2/divulg-1-2-2006.pdf>.
63. [www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos\\_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm](http://www.madrimasd.org/cienciaysociedad/ateneo/dossier/alimentos_funcionales/worldfoodscience/alimentosfuncionales.htm). [Consulta 03 de junio de 2010].
64. [www.aromaticplantproject.com/articles\\_archive/thymeOil\\_essentialprofile.html](http://www.aromaticplantproject.com/articles_archive/thymeOil_essentialprofile.html). [Consulta 03 de junio de 2010].

ANEXO 1

Anexo 1a. Diseño experimental para las películas elaboradas a base de almidón de ocumo chino.

Almidón (%)	A. Orégano (%)	A. Ajo (%)	Listeria	Salmonella	RP	PVA	Solub. agua
8	1	0,5					
6	1	0,5					
6	0,5	0,5					
7	0,5	0					
6	1	0					
8	0	0					
7	0,5	0,5					
7	0	0,25					
6	0	0,25					
6	0	0,5					
8	0,5	0,5					
7	0,5	0,5					
7	0	0					
6	0,5	0,25					
8	1	0,25					
6	0	0,5					
6	0,5	0					
8	1	0					
7	1	0,25					
7	1	0					
8	0	0,25					
7	0	0,5					
6	1	0,25					
7	1	0,5					
8	0	0,5					
8	0,5	0,5					
8	0,5	0					

Anexo 1b. Diseño experimental para las películas elaboradas en base de almidón quitosano.

Quitosano (%)	A. Orégano (%)	A. Ajo (%)	Listeria	Salmonella	RP	PVA	Solub. agua
4,5	1	0,5					
3,5	1	0,5					
3,5	0,5	0,5					
4	0,5	0					
3,5	1	0					
4,5	0	0					
4	0,5	0,5					
4	0	0,25					
3,5	0	0,25					
3,5	0	0,5					
4,5	0,5	0,5					
4	0,5	0,5					
4	0	0					
3,5	0,5	0,25					
4,5	1	0,25					
3,5	0	0,5					
3,5	0,5	0					
4,5	1	0					
4	1	0,25					
4	1	0					
4,5	0	0,25					
4	0	0,5					
3,5	1	0,25					
4	1	0,5					
4,5	0	0,5					
4,5	0,5	0,5					
4,5	0,5	0					

## ANEXO 2

**Anexo 2a.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la PVA debida a las diferentes concentraciones de almidón.

Tukey HSD test; variable PVA (E-10) (ANOVA PVA ALMIDÓN) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,10892, df = 27,000				
	Almidón (%)	{1} - 6,6795	{2} - 7,0976	{3} - 7,9126
1	1		0,002188	0,000127
2	2	0,002188		0,000127
3	3	0,000127	0,000127	

- 1, Almidón al 6%
- 2, Almidón al 7%
- 3, Almidón al 8%

**Anexo 2b.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la PVA debida a las diferentes concentraciones de quitosano.

Tukey HSD test; variable PVA (E-10) (ANOVA PVA QUITOSANO) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,13724, df = 27,000				
	Quitosano (%)	{1} - 11,661	{2} - 9,9913	{3} - 8,8170
1	1		0,000127	0,000127
2	2	0,000127		0,000127
3	3	0,000127	0,000127	

- 1, Quitosano al 3,5%
- 2, Quitosano al 4%
- 3, Quitosano al 4,5%

**Anexo 2c.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la PVA debida a las diferentes concentraciones de aceites.

Tukey HSD test; variable PVA (E-10) (ANOVA PVA ALMIDÓN) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,10892, df = 27,000										
	Aceite	{1} - 8,5346	{2} - 8,1555	{3} - 7,6090	{4} - 7,8349	{5} - 7,2518	{6} - 6,6913	{7} - 7,0954	{8} - 6,3605	{9} - 5,5358
1	0S		0,56266	0,00137	0,02473	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
2	0,25A	0,56266		0,14196	0,75156	0,00182	0,00015	0,00033	0,00015	0,00015
3	0,5A	0,00137	0,14196		0,95291	0,63516	0,00152	0,19626	0,00016	0,00015
4	0,5O	0,02473	0,75156	0,95291		0,09635	0,00020	0,01504	0,00015	0,00015
5	0,5O+0,25A	0,00015	0,00182	0,63516	0,09635		0,12281	0,99519	0,00213	0,00015
6	0,5O+0,5A	0,00015	0,00015	0,00152	0,00020	0,12281		0,48107	0,72021	0,00019
7	1O	0,00015	0,00033	0,196264	0,015045	0,995196	0,481079		0,015940	0,00015
8	1O+0,25A	0,00015	0,00015	0,000161	0,000152	0,002137	0,720210	0,015940		0,00503
9	1O+0,5A	0,00015	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000193	0,000152	0,005031	

S, Sin aceites esenciales.

A, Aceite esencial de ajo.

O, Aceite esencial de orégano.

**Anexo 2d.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la PVA debida a las diferentes concentraciones de aceites.

Tukey HSD test; variable PVA (E-10) (ANOVA PVA QUITOSANO) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,13724, df = 27,000										
	Aceite	{1} - 16,730	{2} - 12,761	{3} - 11,798	{4} - 10,254	{5} - 9,1492	{6} - 8,1057	{7} - 8,8526	{8} - 7,3307	{9} - 6,4272
1	0S		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
2	0,25A	0,00015		0,00325	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
3	0,5A	0,00015	0,00325		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
4	0,5O	0,00015	0,00015	0,00015		0,00068	0,00015	0,00016	0,00015	0,00015
5	0,5O+0,25A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00068		0,00131	0,89329	0,00015	0,00015
6	0,5O+0,5A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00131		0,03755	0,02773	0,00015
7	1O	0,00015	0,00015	0,00015	0,00016	0,89329	0,03755		0,00015	0,00015
8	1O+0,25A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,02773	0,00015		0,00649
9	1O+0,5A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00649	

S, Sin aceites esenciales.

A, Aceite esencial de ajo.

O, Aceite esencial de orégano.

**Anexo 2e.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros almidón, aceite y almidón\*aceite sobre la PVA, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los 2 primeros parámetros.

Univariate Tests of Significance for PVA (E-10) (ANOVA PVA ALMIDÓN) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2822,640	1	2822,640	25915,13	0,000000
Almidón (%)	14,158	2	7,079	64,99	0,000000
Aceite	42,018	8	5,252	48,22	0,000000
Almidón (%)*Aceite	2,120	16	0,132	1,22	0,317269
Error	2,941	27	0,109		

**Anexo 2f.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros quitosano, aceite y quitosano\*aceite sobre la PVA, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros evaluados.

Univariate Tests of Significance for PVA (E-10) (ANOVA PVA QUITOSANO) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	5570,351	1	5570,351	40588,68	0,000000
Quitosano (%)	73,547	2	36,773	267,95	0,000000
Aceite	489,043	8	61,130	445,43	0,000000
Quitosano (%)*Aceite	37,406	16	2,338	17,04	0,000000
Error	3,705	27	0,137		

**ANEXO 3.**

**Anexo 3a.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la solubilidad en agua debida a las diferentes concentraciones de almidón.

LSD test; variable Solb en agua (%) (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,88186, df = 27,000				
	Almidón (%)	{1} - 34,165	{2} - 30,509	{3} - 29,464
1	1		0,000000	0,000000
2	2	0,000000		0,002469
3	3	0,000000	0,002469	

- 1, Almidón al 6%
- 2, Almidón al 7%
- 3, Almidón al 8%

**Anexo 3b.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la solubilidad en agua debida a las diferentes concentraciones de quitosano.

Tukey HSD test; variable Solb en agua (%) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1,2172, df = 27,000				
	Quitosano (%)	{1} - 85,822	{2} - 79,737	{3} - 74,348
1	1		0,000127	0,000127
2	2	0,000127		0,000127
3	3	0,000127	0,000127	

- 1, Quitosano al 3,5%
- 2, Quitosano al 4%
- 3, Quitosano al 4,5%

**Anexo 3c.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la solubilidad en agua debida a las diferentes concentraciones de aceites.

LSD test; variable Solb en agua (%) (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,88186, df = 27,000										
	Aceite	{1} - 38,410	{2} - 36,151	{3} - 33,821	{4} - 34,790	{5} - 29,988	{6} - 28,150	{7} - 30,246	{8} - 26,934	{9} - 23,921
1	0S		0,00028	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
2	0,25A	0,00028		0,00020	0,01836	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
3	0,5A	0,00000	0,00020		0,00524	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
4	0,5O	0,00000	0,01836	0,00524		0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
5	0,5O+0,25A	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000		0,00216	0,63864	0,00000	0,00000
6	0,5O+0,5A	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00216		0,00063	0,03330	0,00000
7	1O	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,63864	0,00063		0,00000	0,00000
8	1O+0,25A	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,03330	0,00000		0,000007
9	1O+0,5A	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	

- S, Sin aceites esenciales.
- A, Aceite esencial de ajo.
- O, Aceite esencial de orégano.

**Anexo 3d.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la solubilidad en agua debida a las diferentes concentraciones de aceites.

Tukey HSD test; variable Solb en agua (%) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1,2172, df = 27,000										
	Aceite	{1} - 91,381	{2} - 88,017	{3} - 82,682	{4} - 82,138	{5} - 80,380	{6} - 77,726	{7} - 77,202	{8} - 71,974	{9} - 68,221
1	0S		0,000546	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151
2	0,25A	0,000546		0,000152	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151
3	0,5A	0,000151	0,000152		0,000151	0,028330	0,000152	0,000151	0,000151	0,000151
4	0,5O	0,000151	0,000151	0,000151		0,174010	0,000154	0,000152	0,000151	0,000151
5	0,5O+0,25A	0,000151	0,000151	0,028330	0,174010		0,007493	0,001017	0,000151	0,000151
6	0,5O+0,5A	0,000151	0,000151	0,000152	0,000154	0,007493		0,995153	0,000151	0,000151
7	1O	0,000151	0,000151	0,000151	0,000152	0,001017	0,995153		0,000152	0,000151
8	1O+0,25A	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000152		0,000220
9	1O+0,5A	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000151	0,000220	

- S, Sin aceites esenciales.
- A, Aceite esencial de ajo.
- O, Aceite esencial de orégano.

**Anexo 3e.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros almidón, aceite y almidón\*aceite sobre la solubilidad en agua, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros evaluados.

Univariate Tests of Significance for Solb en agua (%) (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	53170,58	1	53170,58	60293,48	0,000000
<b>Almidón (%)</b>	219,37	2	109,69	124,38	0,000000
<b>Aceite</b>	1072,99	8	134,12	152,09	0,000000
<b>Almidón (%)*Aceite</b>	66,07	16	4,13	4,68	0,000216
<b>Error</b>	23,81	27	0,88		

**Anexo 3f.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros quitosano, aceite y quitosano\*aceite sobre la solubilidad en agua, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros evaluados.

Univariate Tests of Significance for Solb en agua (%) (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	345331,6	1	345331,6	283700,0	0,000000
<b>Quitosano (%)</b>	1186,3	2	593,1	487,3	0,000000
<b>Aceite</b>	2531,3	8	316,4	259,9	0,000000
<b>Quitosano (%)*Aceite</b>	235,0	16	14,7	12,1	0,000000
<b>Error</b>	32,9	27	1,2		

**Anexo 3g.** Combinación de factores que reducen al mínimo la solubilidad en agua “formulación óptima de películas a base de almidón de ocumo chino”, siendo 1-2-3 para almidón (6% - 7% - 8%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Almidón	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	3,0
Ajo	1,0	3,0	3,0

**Anexo 3h.** Combinación de factores que reducen al mínimo la solubilidad en agua “formulación óptima de películas a base de quitosano”, siendo 1-2-3 para quitosano (3,5% - 4% - 4,5%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Quitosano	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	3,0
Ajo	1,0	3,0	3,0

**ANEXO 4**

**Anexo 4a.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la fuerza a la punción debida a las diferentes concentraciones de almidón.

Tukey HSD test; variable Fuerza a la Punción (N) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00055, df = 27,000				
	Almidón (%)	{1} - 1,1525	{2} - 1,7524	{3} - 2,2441
1	1		0,000127	0,000127
2	2	0,000127		0,000127
3	3	0,000127	0,000127	

- 1, Almidón al 6%
- 2, Almidón al 7%
- 3, Almidón al 8%

**Anexo 4b.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la fuerza a la punción debida a las diferentes concentraciones de quitosano.

Tukey HSD test; variable FP (N) (Spreadsheet38) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00004, df = 27,000				
	Quitosano (%)	{1} - ,28897	{2} - ,72968	{3} - 1,1842
1	1		0,000127	0,000127
2	2	0,000127		0,000127
3	3	0,000127	0,000127	

- 1, Quitosano al 3,5%
- 2, Quitosano al 4%
- 3, Quitosano al 4,5%

**Anexo 4c.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la fuerza a la punción debida a las diferentes concentraciones de aceites.

Tukey HSD test; variable Fuerza a la Punción (N) (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00055, df = 27,000										
	Aceite	{1} - 2,1620	{2} - 1,8419	{3} - 1,6952	{4} - 1,9172	{5} - 1,8664	{6} - 1,7172	{7} - 1,5493	{8} - 1,4358	{9} - 1,2618
1	0S		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
2	0,25A	0,00015		0,00015	0,00033	0,00559	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
3	0,5A	0,00015	0,00015		0,15011	0,00015	0,78262	0,00015	0,00015	0,00015
4	0,5O	0,00015	0,00033	0,15011		0,02017	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
5	0,5O+0,25A	0,00015	0,00559	0,00015	0,02017		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
6	0,5O+0,5A	0,00015	0,00015	0,78262	0,00015	0,00015		0,15011	0,00015	0,00015
7	1O	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,15011	0,00015		0,00015	0,00015
8	1O+0,25A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015		0,00015
9	1O+0,5A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	

S, Sin aceites esenciales.

A, Aceite esencial de ajo.

O, Aceite esencial de orégano.

**Anexo 4d.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Test Tukey que muestra las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la fuerza a la punción debida a las diferentes concentraciones de aceites.

Tukey HSD test; variable FP (N) (Spreadsheet38) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00004, df = 27,000										
	Aceite	{1} - ,97219	{2} - ,90936	{3} - ,85829	{4} - ,86135	{5} - ,74711	{6} - ,63204	{7} - ,58054	{8} - ,54715	{9} - ,50069
1	0S		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
2	0,25A	0,00015		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
3	0,5A	0,00015	0,00015		0,99303	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
4	0,5O	0,00015	0,00015	0,99303		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
5	0,5O+0,25A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015		0,00015	0,00015	0,00015	0,00015
6	0,5O+0,5A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015		0,15011	0,00015	0,00015
7	1O	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,15011		0,00015	0,00015
8	1O+0,25A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015		0,00015
9	1O+0,5A	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	

S, Sin aceites esenciales.

A, Aceite esencial de ajo.

O, Aceite esencial de orégano.

**Anexo 4e.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros almidón, aceite y almidón\*aceite sobre la fuerza a la punción, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros evaluados.

Univariate Tests of Significance for Fuerza a la Punción (N) (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. Of – Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	159,0699	1	159,0699	289834,4	0,00
<b>Almidón (%)</b>	10,7592	2	5,3796	9801,9	0,00
<b>Aceite</b>	3,5450	8	0,4431	807,4	0,00
<b>Almidón (%)*Aceite</b>	1,6732	16	0,1046	190,5	0,00
<b>Error</b>	0,0148	27	0,0005		

**Anexo 4f.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros quitosano, aceite y quitosano\*aceite sobre la fuerza a la punción, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros evaluados.

Univariate Tests of Significance for FP (N) (FUERZA A LA PUNCIÓN QUITOSANO) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	29,11673	1	29,11673	777714,4	0,00
<b>Quitosano (%)</b>	7,21423	2	3,60712	96346,9	0,00
<b>Aceite</b>	1,45570	8	0,18196	4860,2	0,00
<b>Quitosano (%)*Aceite</b>	1,00865	16	0,06304	1683,8	0,00
<b>Error</b>	0,00101	27	0,00004		

**Anexo 4g.** Combinación de factores que maximizan la fuerza a la punción “formulación óptima de películas a base de almidón de ocumo chino”, siendo 1-2-3 para almidón (6% - 7% - 8%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Almidón	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	1,0
Ajo	1,0	3,0	1,0

**Anexo 4h.** Combinación de factores que maximizan la fuerza a la punción “formulación óptima de películas a base de quitosano”, siendo 1-2-3 para quitosano (3,5% - 4% - 4,5%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Quitosano	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	1,0
Ajo	1,0	3,0	1,0

ANEXO 5

**Anexo 5a.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros almidón, aceite y almidón\*aceite sobre la acción antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la concentración de aceite.

Univariate Tests of Significance for Halo de inhibición <i>L. monocytogenes</i> (mm) (ANT LISTERIA ALMIDÓN) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	177,9344	1	177,9344	18219,35	0,000000
Almidón (%)	0,0029	2	0,0014	0,15	0,862931
Aceites	87,7421	8	10,9678	1123,03	0,000000
Almidón (%)*Aceites	0,0355	16	0,0022	0,23	0,998412
Error	0,2637	27	0,0098		

**Anexo 5b.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base de almidón de ocumo chino con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros almidón, aceite y almidón\*aceite sobre la acción antimicrobiana contra *S. entérica*, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la concentración de aceite.

Univariate Tests of Significance for Halo de inhibición <i>S. entérica</i> (mm) (Spreadsheet5) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	32,97539	1	32,97539	7848,503	0,000000
Almidón (%)	0,02317	2	0,01158	2,757	0,081363
Aceite	11,37254	8	1,42157	338,349	0,000000
Almidón (%)*Aceite	0,08587	16	0,00537	1,277	0,279094
Error	0,11344	27	0,00420		

**Anexo 5c.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros quitosano, aceite y quitosano\*aceite sobre la acción antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros evaluados.

Univariate Tests of Significance for Halo de inhibición Listeria (mm) (ANT LISTERIA QUITOSANO) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	355,6835	1	355,6835	143684,6	0,000000
<b>Quitosano (%)</b>	2,4724	2	1,2362	499,4	0,000000
<b>Aceite</b>	71,6859	8	8,9607	3619,8	0,000000
<b>Quitosano (%)*Aceite</b>	0,4527	16	0,0283	11,4	0,000000
<b>Error</b>	0,0668	27	0,0025		

**Anexo 5d.** Análisis de varianza de dos vías para las formulaciones a base quitosano con la incorporación de aceites esenciales. Efecto de los parámetros quitosano, aceite y quitosano\*aceite sobre la acción antimicrobiana contra *S. entérica*, encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros evaluados.

Univariate Tests of Significance for Halo de inhibición <i>S. entérica</i> (mm) (Spreadsheet10) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	98,74558	1	98,74558	239746,8	0,000000
<b>Quitosano (%)</b>	1,79926	2	0,89963	2184,2	0,000000
<b>Aceite</b>	12,54305	8	1,56788	3806,7	0,000000
<b>Quitosano (%)*Aceite</b>	0,20513	16	0,01282	31,1	0,000000
<b>Error</b>	0,01112	27	0,00041		

**Anexo 5e.** Combinación de factores que maximizan la acción antimicrobiana contra *L. monocytogenes* “formulación óptima de películas a base de almidón de ocumo chino”, siendo 1-2-3 para almidón (6% - 7% - 8%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Almidón	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	3,0
Ajo	1,0	3,0	3,0

**Anexo 5f.** Combinación de factores que maximizan la acción antimicrobiana contra *S. entérica* “formulación óptima de películas a base de almidón de ocumo chino” siendo 1-2-3 para almidón (6% - 7% - 8%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Almidón	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	3,0
Ajo	1,0	3,0	3,0

**Anexo 5g.** Combinación de factores que maximizan la acción antimicrobiana contra *L. monocytogenes* “formulación óptima de películas a base de quitosano”, siendo 1-2-3 para quitosano (3,5% - 4% - 4,5%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Quitosano	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	3,0
Ajo	1,0	3,0	3,0

**Anexo 5h.** Combinación de factores que maximizan la acción antimicrobiana contra *S. entérica* “formulación óptima de películas a base de quitosano”, siendo 1-2-3 para quitosano (3,5% - 4% - 4,5%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Quitosano	1,0	3,0	3,0
Orégano	1,0	3,0	3,0
Ajo	1,0	3,0	3,0

## ANEXO 6

**Anexo 6a.** Combinación de factores con el que se logra la formulación a base de almidón de ocumo chino con propiedades óptimas, siendo 1-2-3 para almidón (6% - 7% - 8%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

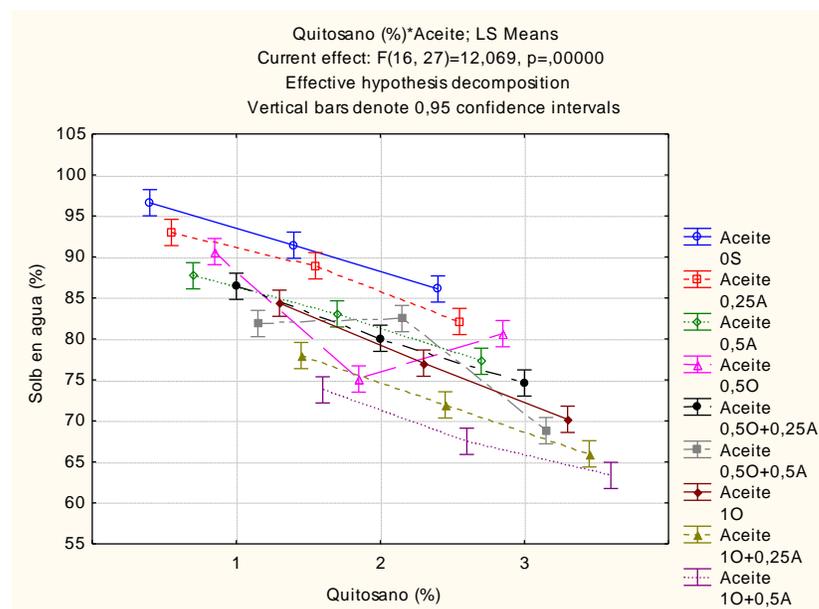
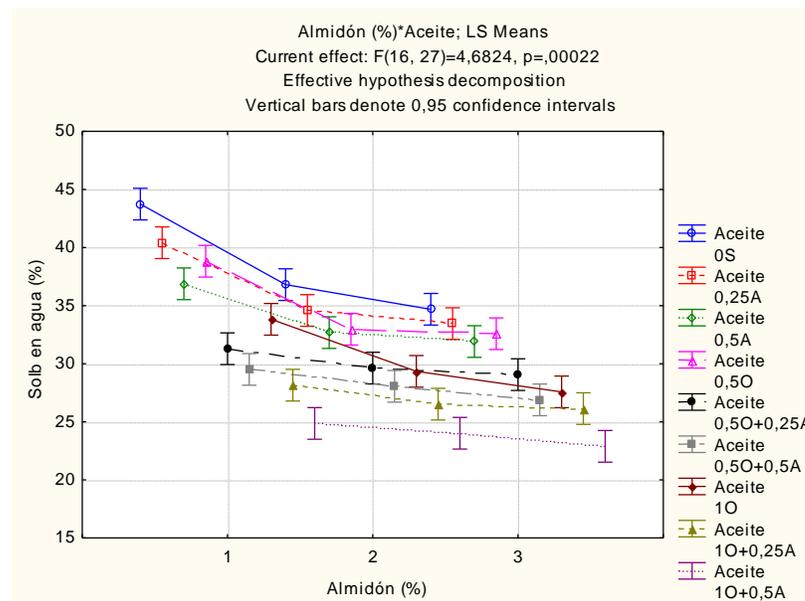
Factor	Low	High	Optimum
Almidón	1,0	3,0	2,0
Orégano	1,0	3,0	2,0
Ajo	1,0	3,0	2,0

**Anexo 6b.** Combinación de factores con el que se logra la formulación a base de quitosano con propiedades óptimas, siendo 1-2-3 para quitosano (3,5% - 4% - 4,5%), para orégano (0% - 0,5% - 1%) y para ajo (0% - 0,25% - 0,5%).

Factor	Low	High	Optimum
Quitosano	1,0	3,0	2,99826
Orégano	1,0	3,0	2,46514
Ajo	1,0	3,0	3,0

ANEXO 7

**Anexo 7a.** Comportamiento de la solubilidad en agua de películas elaboradas a base de almidón de ocumo chino (a) y quitosano (b) a medida de que se incorpora aceites esenciales, observándose que las que presentan 1% orégano (O) y 0,5% de ajo (A) presentan los valores más bajos.

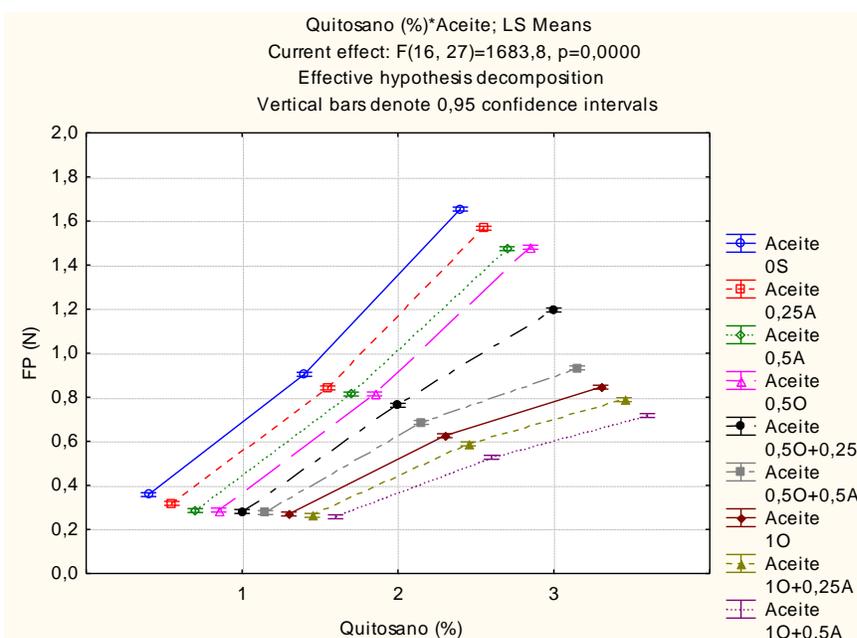
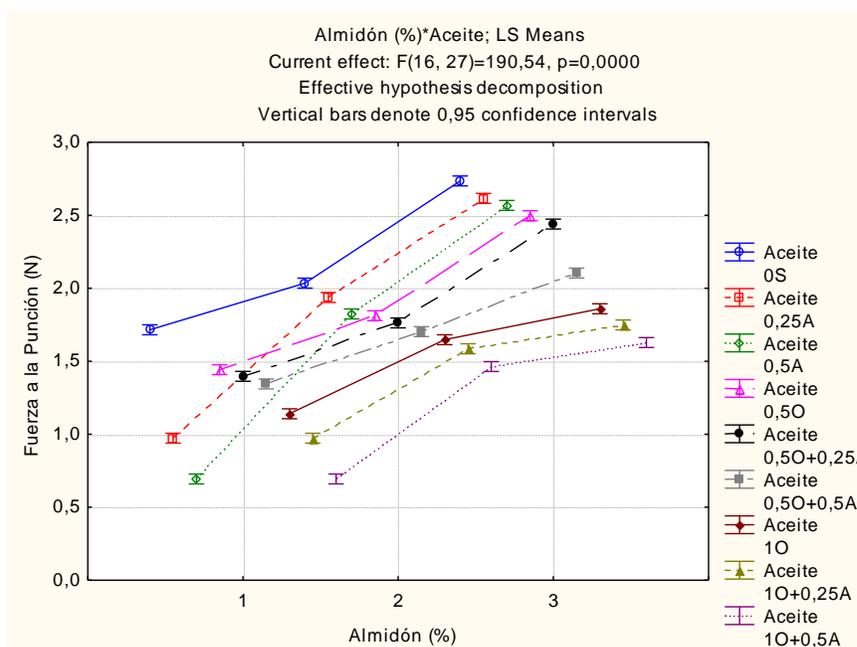


S, Sin aceites esenciales.

A, Aceite esencial de ajo.

O, Aceite esencial de orégano. 135

**Anexo 7b.** Comportamiento de la fuerza a la punción (FP) de películas elaboradas a base de almidón de ocumo chino (a) y quitosano (b) a medida de que se incorpora aceites esenciales, observándose que las que presentan 1% orégano (O) y 0,5% de ajo (A) presentan los valores más bajos.

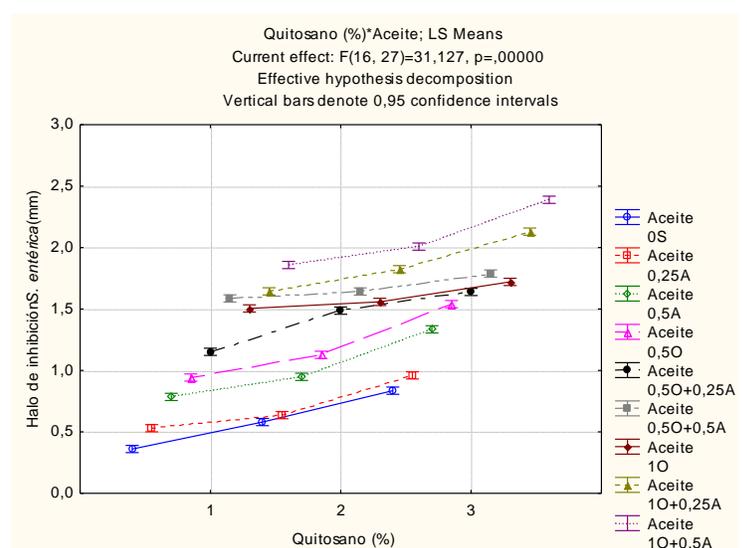
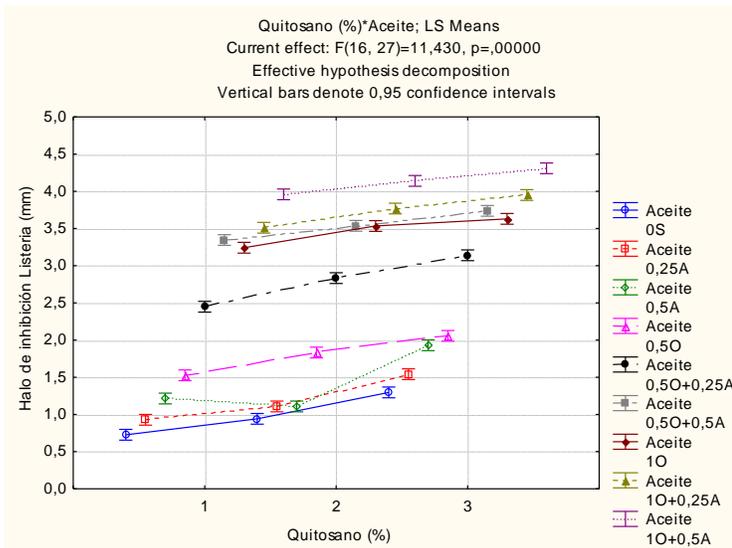
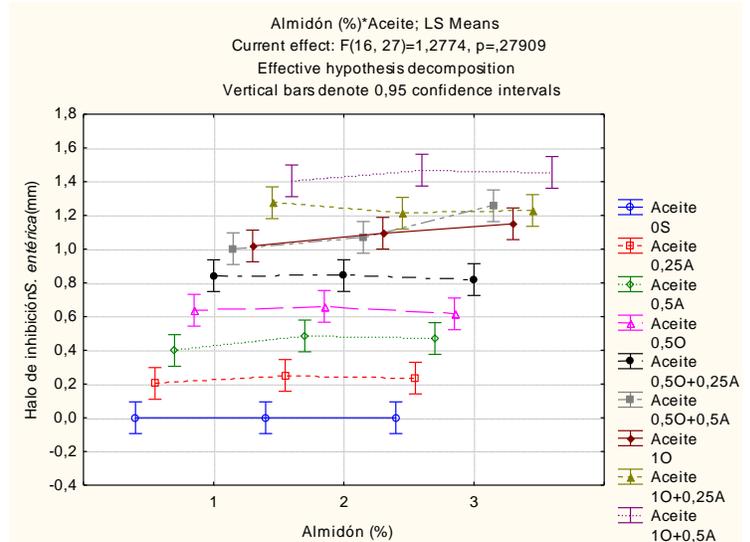
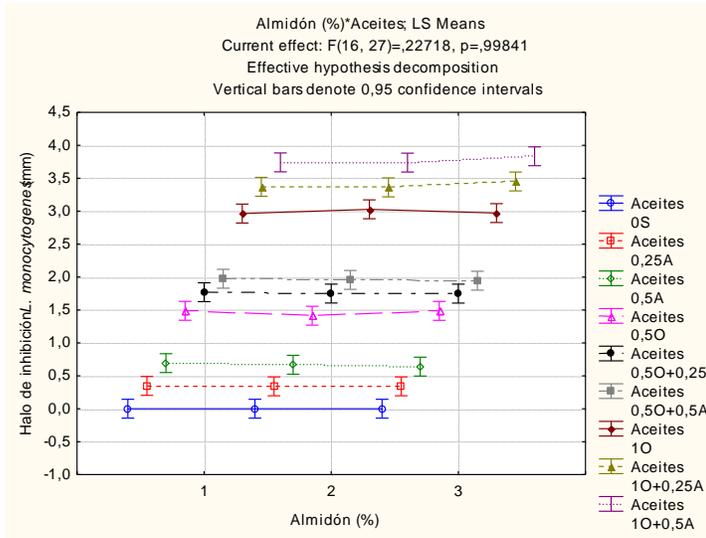


S, Sin aceites esenciales.

A, Aceite esencial de ajo.

O, Aceite esencial de orégano.

**Anexo 7b.** Comportamiento de la actividad antimicrobiana de películas elaboradas a base de almidón de ocumo chino (a y b) y quitosano (c y d) contra *L. monocytogenes* (a y c) y *S. entérica* (b y d). A medida de que se incorpora aceites esenciales, observándose que las que presentan 1% orégano (O) y 0,5% de ajo (A) presentan los valores más altos.



S, Sin aceites esenciales.  
A, Aceite esencial de ajo.  
O, Aceite esencial de orégano.