

**UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN**  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS



**Biopelícula activa a base de almidón de mandioca (*Manihot Esculenta*) aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) reforzado con organoarcillas**

Autoras:

**Jackeline Ibeth Sánchez Calancha**  
**Linda Scarlet Valdez Dávila**

Asesor:

**Dr. Noe Benjamín Pampa Quispe**

Lima, Febrero de 2019

## DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA DEL INFORME DE TESIS

Noe Benjamín Pampa Quispe, de la Facultad de Ingeniería, Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, de la Universidad Peruana Unión.

### DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: "BIOPELÍCULA ACTIVA A BASE DE ALMIDÓN DE MANDIOCA (*Manihot Esculenta*) ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) REFORZADO CON ORGANOARCILLAS" constituye la memoria que presenta las Bachilleres Jackeline Ibeth Sánchez Calancha y Linda Scarlet Valdez Dávila para aspirar al título de Profesional de Ingeniería de Alimentos, cuya tesis ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente constancia en Ñaña, a los 8 días de Abril del año 2019.



Dr. Noé Benjamín Pampa Quispe

biopelícula activa a base de almidón de mandioca (manihot  
esculenta) aceite esencial de romero (rosmarinus officinalis) reforzado  
con organoarcillas

# TESIS

Presentada para optar el Título Profesional de Ingeniero de Alimentos

## JURADO CALIFICADOR



PRESIDENTE  
Dr. Rodrigo Alfredo Matos Chamorro



SECRETARIO  
Ing. Guido Fulgencio Anglas Hurtado



VOCAL  
Dr. Reynaldo Justino Silva Paz



VOCAL  
Dr. Julio Florencio Paredes Guzmán



ASESOR  
Dr. Noe Benjamín Pampa Quispe

**Lima, 14 de febrero del 2019**

## **Dedicatoria**

*El presente trabajo de investigación lo dedicamos principalmente a Dios, por ser nuestro inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de nuestros anhelos más deseados.*

*A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos.*

*Jackeline & Scarlet*

## **Agradecimientos**

Agradecemos a Dios por bendecirnos siempre, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias a nuestros padres: Felicia Calancha, Katherine Sánchez y Alfredo Valdez Loya, Eva Dávila Panduro, por ser los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestras expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

Agradecemos a nuestros docentes de la Escuela de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Peruana Unión, por haber compartido sus conocimientos, de manera especial, al Doctor Noe Benjamín Pampa Quispe asesor de nuestra tesis quien ha guiado con su paciencia, y su rectitud como docente.

A la Universidad Nacional de Trujillo (UNT) y Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) por permitirnos el acceso a sus laboratorios para los ensayos experimentales de propiedades mecánicas y propiedades morfológicas (DRX y MEB), respectivamente.

Muchas gracias Dr. Raúl Benito Siche Jara, Msc. Clemente Luyo Caycho, Ing. Henry Huanca Loza, Ing. Marita De la Vega y a todas las personas que nos han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y nos compartieron sus conocimientos.

## INDICE GENERAL

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1    Biopelícula.....	3
2.1.1    Biopelícula activa .....	4
2.1.2    Biopelícula inteligente .....	5
2.1.3    Biopelículas a base de almidón .....	6
2.2    Almidón termoplástico .....	6
2.2.1    Fuentes de almidón .....	9
2.2.2    Almidón de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ).....	10
2.3    Arcilla bentonita .....	13
2.3.1    Montmorillonita (MMT) .....	14
2.4    Tecnología de procesamiento para biopelículas .....	16
2.4.1    Tecnología por extrusión termoplástica .....	16
2.4.2    Tecnología por método casting.....	16
2.5    Plastificantes .....	17
2.6    Antimicrobiano .....	17
2.7    Emulsionante .....	18
2.8    Técnicas de caracterización .....	19
2.8.1    Propiedades mecánicas.....	19
2.8.2    Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	20
2.8.3    Difracción de rayos X (DRX).....	21
2.8.4    Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	22
2.8.5    Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	23
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
3.1    Lugar de ejecución .....	25
3.2    Materiales e insumos.....	25

3.2.1. Materia prima .....	25
3.2.2. Insumos .....	25
3.2.3. Materiales .....	25
3.2.4. Equipos .....	26
3.2.5. Reactivos .....	27
3.3 Metodología .....	27
3.3.1. Almidón .....	27
3.3.2. Organoarcilla .....	31
3.3.3. Biopelícula .....	32
3.4 Diseño estadístico .....	35
3.4.1 Análisis estadístico .....	38
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
4.1 Almidón .....	39
4.1.1. Extracción del almidón de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ) .....	39
4.1.2. Caracterización de las propiedades del almidón .....	40
4.2 Organoarcilla .....	48
4.2.1 Obtención y caracterización de la organoarcilla .....	48
4.3 Biopelículas .....	50
4.3.1. Caracterización de la biopelícula activa .....	50
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	71
5.1 Conclusiones .....	71
5.2 Recomendaciones .....	72
REFERENCIAS .....	73
ANEXOS .....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de la mandioca .....	11
<b>Tabla 2.</b> Composición de almidón de mandioca con otros tubérculos.....	12
<b>Tabla 3.</b> Parámetros y niveles del diseño ortogonal taguchi L <sub>4</sub> (2 <sup>3</sup> ).....	36
<b>Tabla 4.</b> Diseño ortogonal taguchi para variables independientes y dependientes.....	36
<b>Tabla 5.</b> Parámetros y niveles del diseño factorial fraccionado (DFF) 3 <sup>3-1</sup> .....	37
<b>Tabla 6.</b> Variables independientes y dependientes del diseño factorial fraccionado 3 <sup>3-1</sup> .....	37
<b>Tabla 7.</b> Propiedades funcionales y análisis de varianza del almidón de mandioca.....	39
<b>Tabla 8.</b> Composición fisicoquímica del almidón nativo de mandioca .....	42
<b>Tabla 9.</b> Contenido de amilosa y amilopectina del almidón de mandioca .....	43
<b>Tabla 10.</b> Propiedades funcionales de almidón de mandioca .....	43
<b>Tabla 11.</b> Temperatura y entalpía de gelatinización de almidón de mandioca.....	47
<b>Tabla 12.</b> Propiedades mecánicas de las biopelículas.....	51
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza de fuerza de ruptura (MPa) .....	52
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza de elongación (%).....	54
<b>Tabla 15.</b> Permeabilidad de vapor de agua y % solubilidad.....	57
<b>Tabla 16.</b> Análisis de varianza de permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	58
<b>Tabla 17.</b> Análisis de varianza del índice de solubilidad de agua .....	61
<b>Tabla 18.</b> Actividad antimicrobiana.....	65
<b>Tabla 19.</b> Análisis de varianza de actividad antimicrobiana ( <i>Enterobacterias</i> ).....	66
<b>Tabla 20.</b> Análisis de varianza de actividad antimicrobiana ( <i>S. Aureus</i> ).....	68



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la amilosa .....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la amilopectina. ....	9
<b>Figura 3.</b> Planta de mandioca (A) y raíz de mandioca (B). ....	11
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica de la ley de Bragg.....	22
<b>Figura 5.</b> Tipos de extracción tecnológica de almidón A) vía seca B) vía húmeda.....	28
<b>Figura 6.</b> Gráfica de efecto principal para la temperatura de gelatinización.....	40
<b>Figura 7.</b> Micrografías del grano de almidón de mandioca obtenidas por MEB. A)X500, B) X1000, C)X5000 D)X10000 .....	45
<b>Figura 8.</b> Termograma por DSC de almidón de mandioca.....	47
<b>Figura 9.</b> DRX de la organoarcilla (OA).....	48
<b>Figura 10.</b> Gráficas de superficie de respuesta y contorno de fuerza de ruptura (MPa). ....	53
<b>Figura 11.</b> Gráficas de superficie de respuesta y contorno de ISA.....	63
<b>Figura 12.</b> Inhibición de microorganismos.....	66
<b>Figura 13.</b> Gráfico de superficie de respuesta y contorno de <i>enterobacterias</i> . ....	68
<b>Figura 14.</b> Gráfica de superficie de respuesta y contorno de <i>staphylococcus aureus</i> .....	70

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Contenido de amilosa.....	89
<b>Anexo 2.</b> Equipos.....	90
<b>Anexo 3.</b> Biopelícula de almidón de mandioca, aceite esencial y organoarcilla .....	91
<b>Anexo 4.</b> Acondicionamiento de las biopelículas .....	92
<b>Anexo 5.</b> Coeficiente de regresión lineal de fuerza de ruptura (MPa).....	93
<b>Anexo 6.</b> Gráfica de Pareto de fuerza de ruptura (MPa).....	93
<b>Anexo 7.</b> Coeficiente de regresión lineal de la elongación (%) .....	94
<b>Anexo 8.</b> Gráfica de Pareto de elongación (%) .....	94
<b>Anexo 9.</b> Coeficiente de regresión de PVA .....	95
<b>Anexo 10.</b> Gráfica de Pareto de PVA .....	95
<b>Anexo 11.</b> Coeficiente de regresión de ISA.....	96
<b>Anexo 12.</b> Gráfica de Pareto de ISA.....	96
<b>Anexo 13.</b> Coeficiente de regresión de <i>enterobacteria</i> (UFC/g).....	97
<b>Anexo 14.</b> Gráfica de Pareto de actividad antimicrobiana (enterobacterias (UFC/g)) .....	97
<b>Anexo 15.</b> Coeficiente de regresión de actividad antimicrobiana ( <i>s. aureus</i> (UFC(g)).....	98
<b>Anexo 16.</b> Gráfica de Pareto de actividad antimicrobiana ( <i>s. aureus</i> (UFC/g)).....	98

## Nomenclatura

% S:	Solubilidad en agua
$\Delta H$ :	Diferencial de entalpía de gelatinización, (J/g, b.s)
$2d$ :	Distancia de un plano a otro
A:	Área de película expuesta, (m <sup>2</sup> )
AA:	Actividad antimicrobiana
AR:	Aceite esencial de romero
ATP:	Almidón termoplástico
DFP:	Diseño factorial fraccionado
$dm /dt$ :	Diferencia de masa a través de tiempo
DRX:	Difracción de rayos X
DSC:	Calorimetría diferencial de barrido
EM:	Módulo de elasticidad, (%)
FAO:	Food and agriculture organization
IAA:	Índice de absorción de agua, (g gel/g muestra)
ISA:	Índice de solubilidad de agua, (%)
MEB:	Microscopía electrónica de barrido
MMT:	Montmorillonita
MMT-OM:	Montmorillonita orgánicamente modificada
OA:	Organoarcilla
AM:	Almidón de mandioca
OMMT-CS:	Montmorillonita órgano-modificada con almidón catiónico
$PA_1$ :	Presión a la cual está sujeta la película al interior de tubo, (KPa)
$PA_2$ :	Presión sobre la película, (KPa)
PH:	Poder de hinchamiento, (%)

<i>G/100G:</i>	Partes por cien
<i>PM:</i>	Propiedades mecánicas
<i>PVA:</i>	Permeabilidad al vapor de agua, (g mm/h m <sup>2</sup> KPa)
<i>R<sub>1</sub>:</i>	Humedad relativa de la cámara, en fracción, (%HR)
<i>R<sub>2</sub>:</i>	Humedad relativa interna de tubo de prueba, en fracción, (%HR)
<i>S :</i>	Presión de vapor saturación a la temperatura experimental, (KPa)
<i>TG:</i>	Temperatura de gelatinización, (°C)
<i>TS:</i>	Tensión de fractura, (MPa)
<i>WVT:</i>	Índice de transferencia al vapor de agua
<i>θ<sub>g</sub> :</i>	Ángulo de Bragg
<i>T<sub>f</sub>:</i>	Temperatura final, (°C)
<i>T<sub>O</sub>:</i>	Temperatura inicial, (°C)
<i>T<sub>p</sub>:</i>	Temperatura pico, (°C)
<i>n :</i>	Orden de reflexión
<i>mA:</i>	Miliamperios

## Resumen

El presente estudio tuvo por objetivo desarrollar biopelículas activas a base de almidón de mandioca aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) reforzado con organoarcilla. El trabajo consistió en dos partes, la evaluación del almidón de mandioca, mediante un diseño ortogonal  $L_4 (2^3)$ , evaluando el efecto del tipo de extracción, temperatura de secado y tipo de geometría sobre la temperatura de gelatinización, poder de hinchamiento e índice de absorción de agua y solubilidad de agua. El análisis de varianza mostró que el tipo de extracción generó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la temperatura de gelatinización. El mejor tratamiento se eligió mediante la gráfica de efectos principales (tipo de extracción: vía húmeda, temperatura: 55 °C, tipo de geometría: láminas) al cual se le realizó análisis fisicoquímicos, propiedades funcionales, morfológico y térmicos. De igual forma se caracterizó la organoarcilla sódica mediante la DRX presentando un pico característico en  $2\theta = 7,52^\circ$  ( $d_{001} = 11,768 \text{ \AA}$  o 1,17 nm). En la segunda parte se trabajó con un diseño factorial fraccionado  $3^{3-1}$  para la elaboración de biopelículas producidas a partir de soluciones concentradas de organoarcilla (0,2; 0,4; 0,6 g/100g), aceite esencial (0,1; 0,2, 0,3 g/100g) y almidón de mandioca (5, 6, 7 g/100g), donde se caracterizó sus propiedades mecánicas (fuerza de ruptura y elongación), PVA, solubilidad, actividad antimicrobiana (*enterobacterias* y *Staphylococcus aureus*). El análisis de varianza indicó que las variables independientes (organoarcilla, aceite esencial y almidón) generaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las propiedades mecánicas, solubilidad y actividad antimicrobiana de las biopelículas; sin embargo la variable significativa para PVA fue el almidón de mandioca. Se obtuvieron películas homogéneas con mayor resistencia a la fuerza de ruptura, elongación, solubilidad, permeabilidad e inhibidor de *enterobacterias* y *Staphylococcus aureus* en concentraciones de organoarcilla (0,4 a 0,6 g/100g), aceite esencial ( $\geq 0,3$  g/100g) y almidón de mandioca (6 a 7 g/100g).

**Palabras clave:** Biopelícula, organoarcilla, aceite esencial de romero, almidón de mandioca.

## Abstract

The objective of this study was to develop active biofilms based on cassava starch reinforced with rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) and organoarcilla. The work consisted of two parts, the evaluation of cassava starch, by means of an orthogonal design  $L_4$  ( $2^3$ ), evaluating the effect of the extraction type, drying temperature and geometry type on the yield, temperature of gelatinization, swelling power and water absorption index and water solubility. The analysis of variance showed that the type of extraction generated significant difference ( $p < 0.05$ ) in the temperature of gelatinization. The best treatment was chosen by means of the graph of main effects (type of extraction: humid way, temperature: 55 °C, type of geometry: sheets) to which physicochemical, functional, morphological and thermal analyzes were carried out. Similarly, the organoclay sodium was characterized by the XRD presenting a characteristic peak at  $2\theta = 7,52^\circ$  ( $d_{001} = 11,768 \text{ \AA}$  o 1,17 nm). In the second part we worked with a fractional factorial design 33-1 for the production of biofilms produced from concentrated solutions of organoclay (0,2; 0,4;0,6 g/100g), essential oil (0,1; 0,2; 0,3 g/100g) and cassava starch (5, 6, 7 g/100g), where its mechanical properties (breaking strength and elongation), WVP, solubility, antimicrobial activity (*enterobacteriaceaes* and *Staphylococcus aureus*) were characterized. The analysis of variance indicated that the independent variables (organoclay, essential oil and starch) generated significant differences ( $p < 0,05$ ) in the mechanical properties, solubility and antimicrobial activity of biofilms; however, the significant variable for PVA was cassava starch. Homogeneous films were obtained with greater resistance to the breaking strength, elongation, solubility, permeability and inhibitor of Enterobacteriaceae and Staphylococcus aureus and to organoclay (0.4 to 0.6 g / 100 g), essential oil ( $\geq 0.3$  g / 100g) and cassava starch (6 to 7 g / 100g).

**Key words:** Biofilm, organoclay, rosemary essential oil, cassava starch.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Los plásticos derivados de petróleo crudo han suministrado la mayor parte de los materiales para la fabricación de envases, debido a sus características (elevada disponibilidad, buena resistencia mecánica, física y de barrera). Sin embargo, la acumulación de estos envases sintéticos han generado serios problemas ecoambientales por su falta de biodegradabilidad, lo que ha impulsado a la búsqueda de bioplásticos degradables como fuente de conservación y reducción en el impacto ambiental (Díaz, 2015; Silva y Silva, 2016).

Los bioplásticos degradables son aquellos biomateriales que son capaces de descomponerse químicamente por la acción de microorganismos ya sea con ausencia o presencia de oxígeno en el medio ambiente. Entre estos biopolímeros destaca el almidón por sus grandes ventajas como su bajo costo, biodegradabilidad, fácil acceso y gran disponibilidad en el mercado; también tiene una gran importancia a nivel industrial en la producción de envases biodegradables ya que permite obtener películas homogéneas, inodoras e incoloras con baja permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono y lípidos (Ortiz *et al.*, 2015).

Las películas a base de biopolímeros presentan ciertos inconvenientes tales como baja resistencia mecánica, alta higroscopicidad y permeabilidad al vapor de agua, que conlleva a tener propiedades mecánicas inferiores en la tensión máxima, el porcentaje de elongación y el módulo de elasticidad (Oses, 2006). Esto genera que las biopelículas se degradan fácilmente, sean frágiles y se produzca una ruptura en su superficie, reduciendo la vida útil del producto además, de pérdida de aroma y daños físicos en el alimento (Pelissari, 2013 y Avelino, 2009).

Una de las posibles estrategias para mejorar las propiedades de biopelículas a partir de almidón de mandioca (*Manihot esculenta*), es mediante la combinación de otros materiales como el glicerol que es un plastificante que permite disminuir las fuerzas de atracción intermolecular aumentando su flexibilidad y resistencia a la fractura (Mali *et al.*, 2005).

Las películas sin presencia de agentes antimicrobianos o antioxidantes quedan expuestas a la contaminación microbiana (Vázquez y Guerrero, 2013); los microorganismos crecerán en forma diferente después de su adhesión a su superficie, causando la putrefacción, olores desagradables y convirtiéndose en fuente de transmisión de patógenos (Holah et al., 1992).

Por ello la adición de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) en el desarrollo de películas, mejora sus características de barrera aumentando la fracción hidrófoba de estas, por otro lado actúan como vehículo de sustancias activas para prevenir e inhibir el desarrollo y crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos, alargando así su vida anaquel y conservando sus características sensoriales (color, olor y sabor) (Quintero, Falguera y Muñoz, 2010; Mendoza, Rodríguez, 2007).

La incorporación de la organoarcilla a las biopelículas a base de almidón refuerza a las propiedades mecánicas tales como su fuerza de ruptura y elongación, da mayor resistencia al calor y proporciona propiedades de barrera mejoradas (Bae et al., 2009).

El objetivo de la investigación es desarrollar y caracterizar la biopelícula activa a base de almidón de mandioca (*Manihot esculenta*) y aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) reforzado con arcilla orgánicamente modificada (organoarcilla).

Los objetivos específicos fueron extraer almidón nativo de mandioca (*Manihot esculenta*) empleando la tecnología de vía húmeda y seca, determinar las propiedades tecnológicas, fisicoquímicas, morfológicas y térmicas del almidón nativo de mandioca (*Manihot esculenta*), caracterizar la organoarcilla a partir de la arcilla bentonita sódica, empleando las sales de amonio cuaternarios, desarrollar la biopelícula activa a base de almidón de mandioca (*Manihot esculenta*), aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) reforzado con organoarcilla por proceso tecnológico de casting aplicando diseño de experimentos y caracterizar las propiedades mecánicas, permeabilidad de vapor de agua, solubilidad de agua y actividad antimicrobiana de la biopelícula activa.



## CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biopelícula

Los polímeros sintéticos, son materiales más usados por la industria, contribuyen al aumento de desechos, teniendo gran influencia indeseable para el medio ambiente. En general, deriva de ello el dióxido de carbono, gas metano, componentes celulares microbianos y otros productos; para ello surge la intención de sustituir los embalajes sintéticos, por materiales con capacidad de biodegradación (Leja y Lewandowicz, 2010).

El interés creciente en la producción de bioplásticos degradables, a partir de biopolímeros que pueden ayudar a minimizar el impacto ambiental de los plásticos sintéticos. Sin embargo, la producción de los polímeros biodegradables todavía presenta un alto costo en comparación con la producción de los polímeros convencionales. Por lo tanto, los polímeros de origen agrícola, como el almidón, pueden utilizarse para formular envases biodegradables (Bertan, 2003). Los polímeros más usados son poliésteres alifático (polylactide, polietileno), proteínas termoplásticas y almidón; este último obtuvo mejores resultados en la evolución de sus propiedades de barrera (Liao y Wu, 2009).

Camacho, Vega y Campos (2011) indican que los polímeros biodegradables o biopolímeros son utilizados en películas activas, solo son los que tienen peso molecular alto ya que proporcionan fuerza de cohesión, capacidad de fusión, los usos y beneficios son:

- Mayor plazo de caducidad.
- Mejora las características organolépticas como olor, apariencia, sabor.
- Reducción del volumen y residuos de empaque.
- Función de soporte de agentes antimicrobianos y antioxidantes.

Los polímeros se clasifican, en no renovables cuya procedencia es del petróleo, como por ejemplo, el poli (ε-caprolactona) (PCL) y los renovables derivados de biomasa como el almidón,

celulosa, quitosano, colágeno, proteína entre otros (Oliveira, 2009). Existen tipos de polímeros biodegradables disponibles en el mercado:

- Agropolímeros: polímeros que se encuentra presente en la naturaleza o de obtención del fraccionamiento de la biomasa como las proteínas y polisacáridos.
- Poliésteres biodegradables: polímeros obtenidos a causa de la fermentación de la biomasa, plantas genéticamente modificadas o monómeros (Averous y Boquillon, 2004). Las ventajas de las películas comestibles y biodegradables pueden justificarse con base en las posibilidades funcionales de las mismas, controlar la migración de vapor de agua; permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono y la migración lipídica de un sistema alimenticio. Además, pueden introducirse aditivos a la película, tales como: antioxidantes, aromas y agentes antimicrobianos, mejorando con ello la integridad del producto (Martins De Sousa, 2012).

### **2.1.1 Biopelícula activa**

Biomateriales con tecnologías destinadas a interactuar con el entorno de gas interno y / o directamente con el producto, esta nueva metodología modifican el entorno del gas (interactuar con la superficie del producto) mediante la eliminación de gases o la adición de gases al espacio libre del paquete. La atmósfera interna puede estar controlada por sustancias que liberan gases o vapores. Algunos ejemplos de sistemas de envasado activos incluyen captadores de oxígeno, captadores o emisores de dióxido de carbono, adsorbedores o controladores de humedad, captadores de etileno, emisores o absorbentes de aroma, sistemas enzimáticamente activos y sistemas antimicrobianos. Incorporado en las propiedades antimicrobianas como un antioxidantes, innovador concepto de embalajes de los alimentos, así extienden la vida útil o mantener, mejorar o controlar la calidad y la seguridad de los alimentos (Ahvenainen, 2014).

Estos nuevos sistemas de envasado de alimentos se han desarrollado como respuesta a las tendencias en las preferencias de los consumidores hacia productos alimenticios conservados,

frescos, sabrosos y convenientes con una vida útil prolongada. Además, presentan grandes desafíos para la industria del envasado de alimentos que actúa como fuerza motriz para el desarrollo de conceptos de embalajes nuevos y mejorados que extienden la vida útil, manteniendo la seguridad y calidad de los alimentos envasados (López-Rubio *et al.*, 2004).

### **2.1.2 Biopelícula inteligente**

Los empaques inteligentes son sistemas capaces de llevar a cabo funciones inteligentes (detectar, registrar, rastrear, comunicar y aplicar lógica científica) para facilitar la toma de decisiones, extender la vida útil, mejorar su calidad, proporcionar información y advertir sobre posibles problemas. Su capacidad de comunicación: dado que el envase y el alimento se mueven constantemente durante todo el ciclo de la cadena de suministro, el empaque es el mejor acompañante del alimento y se encuentra en la mejor posición para detectar cambios significativos (Yam, Takhistov, y Miltz, 2005).

Se incorpora sensores o nano sensores para monitorear e informar sobre el estado de los alimentos, son empaques que detectan algunos de los cambios físicos del alimento, usado para verificar la efectividad e integridad de los sistemas de envasado activo; son capaces de detectar y proporcionar información sobre la función y las propiedades de los alimentos envasados, proporcionan garantías de integridad de los envases, pruebas de manipulación, seguridad y calidad del producto, utilizados también en aplicaciones tales como autenticidad, antirrobo y trazabilidad del producto (Coles, McDowell y Kirwan, 2003).

Hay dos tipos básicos de dispositivos de empaque inteligente: portadores de datos (etiquetas de códigos de barras e identificación por radiofrecuencia que se utilizan para almacenar y transmitir datos, e indicadores de empaques (como indicadores de tiempo-temperatura, indicadores de gas, biosensores) que se utilizan para supervisar el entorno externo y emitir advertencias. Estos dispositivos proporcionan un canal de comunicación entre el entorno

externo y otros componentes en el sistema, además es un empaque inteligente empleado en múltiples dispositivos de toda la industria (Yam, Takhistov y Miltz, 2005).

### **2.1.3 Biopelículas a base de almidón**

Los problemas causados por el material sintético de los embalajes, ha llevado a la industria a prestar atención a las películas a partir de polímeros naturales que constituyen una alternativa real, para disminuir el uso de materiales no degradables y no renovables en la industria del embalaje (Carvalho, Avérous y Tadini, 2011).

Por ello científicos de toda parte del mundo desarrollan películas a base de un biopolímero como el almidón, que representa la materia prima (MP) más utilizada, sea en su forma nativa, modificada químicamente o como mezclas entre almidones de diferentes fuentes. El uso de esta MP es debido a su abundancia en el reino vegetal y la elevada degradabilidad, además sus diferentes características morfológicas, funcionales están relacionadas con la proporción y la estructura de la amilopectina y amilosa en el gránulo de almidón, haciendo posible la aplicación diversificada de este material en una variedad de productos industrializados. Las propiedades de estos polímeros han sido ampliamente estudiadas por diferentes investigadores tales como Araujo, (2008); Miramont, (2012); Mehvar y Han, (2006); Arévalo *et al.*, (2018); Wilhem *et al.*, (2003); Pelissari *et al.*, (2009); Rocha *et al.*, (2014); Chivrac *et al.*, (2010); Flores *et al.*, (2006), Jyothi *et al.*, (2007); Borda, (2008); Charles *et al.*, (2005) y otros, donde sus investigaciones realizadas han mostrado que estos recubrimientos pueden reemplazar los materiales de empaquetamiento tradicionales, pues sus propiedades son equivalentes.

## **2.2 Almidón termoplástico**

El almidón es el más abundante carbohidrato que se encuentra en los tejidos de gránulos intracelulares; además es conocido como fécula no obstante este término va dirigido a la sustancia amilácea extraída de las raíces, tubérculos y rizomas, el término almidón es usado para

los extraídos de granos y cereales. Las fuentes principales de almidón en el la industria son: maíz, trigo, arroz, papa y mandioca (Oliveira, 2009).

Por su uso en diferentes aplicaciones en la industria alimentaria, la evaluación de sus propiedades funcionales dependerá de su fuente botánica, modificaciones químicas, composición, pH y fuerza iónica (Famá, Rojas, Goyanes y Gerschenson, 2005).

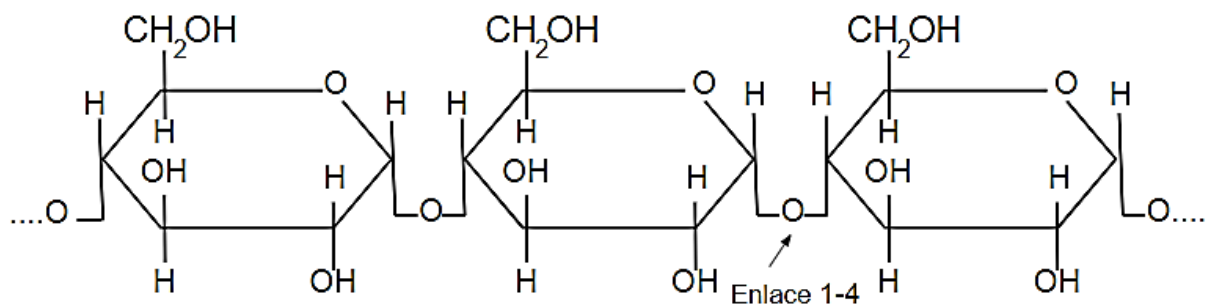
Según Martínez (2015) el almidón termoplástico se puede obtener del almidón nativo mediante la ruptura de gránulos y plastificación. Se produce a través de la transformación de gránulos en un material homogéneo, destruyendo los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de almidón y con la formulación de enlaces de hidrógenos de las moléculas del plastificante añadido.

Los almidones se rompen rápidamente al ser secados en condiciones ambientales, por la presencia de sus enlaces de hidrógeno intramoleculares en la amilosa y amilopectina. Sin embargo la presencia de plastificantes en altas temperaturas, hace que el almidón se disuelve y fluye rápidamente, permitiendo procesar los plásticos convencionales a través de equipos de extrusión, el termo formado, moldeado por inyección y moldeo por comprensión al vaciado o casting (Ma *et al.*, 2007).

El almidón tiene una naturaleza hidrofílica que no permite su uso en ambientes con alta humedad, en comparación de los polímeros tradicionales. A pesar de ello esto se puede evitar mediante algunas técnicas como el uso de plastificantes, almidón modificado, lípidos entre otros (Martínez, 2015).

La función de los plastificantes es atraer las moléculas del agua alrededor de ellos, provocando la reducción de su peso molecular del almidón y después incrementar la flexibilidad del mismo. El almidón es transformado de un material granular cristalino a una pasta amorfa durante el proceso de plastificación (Smits *et al.*, 2003).

El gránulo de almidón es una mezcla de dos polisacáridos, amilosa y amilopectina, en diferentes proporciones en función del origen botánico. Según Badui (2006), el almidón es una mezcla de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina; el primero es producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1,4) que tiene varias cadenas lineales con 200 - 2500 unidades repetitivas de  $\alpha$ - maltosa, esta tiene una facilidad para adquirir una conformación tridimensional helicoidal en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa, como se muestra en la figura 1.



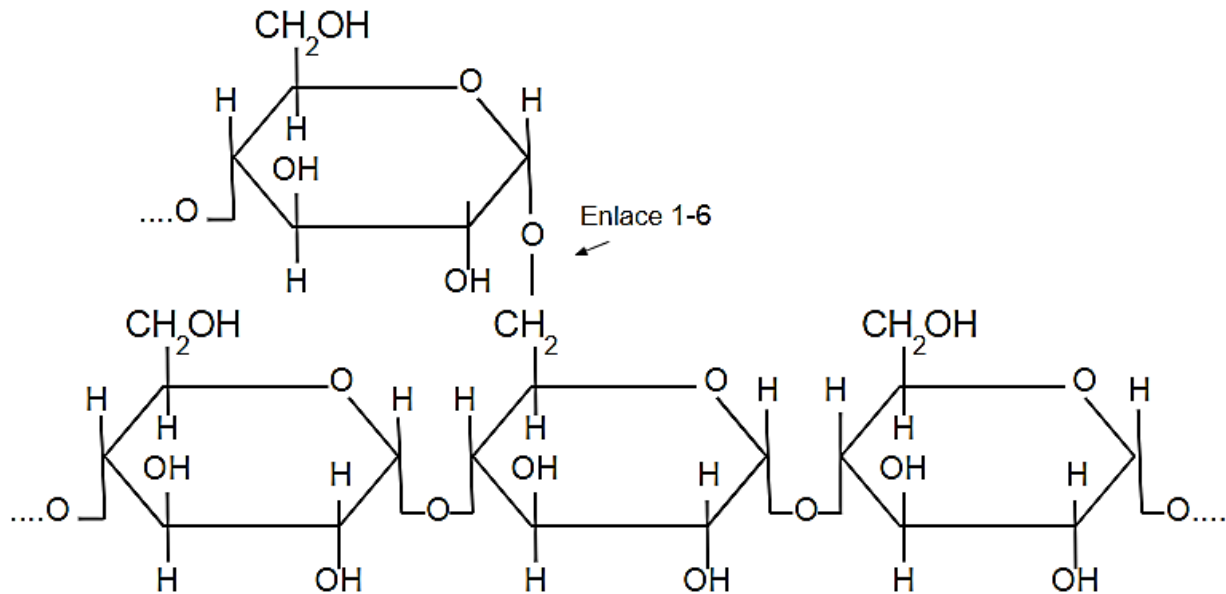
**Figura 1.** Estructura química de la amilosa (Badui, 2006)

Esta molécula es insoluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas mediante puentes de hidrógeno generando una estructura helicoidal que es capaz de desarrollar un color azul por la formación de un complejo yodo (De los Ángeles, 2016).

Los almidones ricos en amilosa, presentan buenas propiedades mecánicas (Tensión, deformación, rigidez, elasticidad), son menos solubles y pueden formar geles opacos (Ríos, 2014).

La amilopectina tiene una estructura con ramificaciones de formas moleculares similar a la de un árbol, cuyas ramas están unidas al tronco central por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa, las cadenas formadas pueden contar de 10,000 a 20,000

unidades (Badui, 2006). Como se muestra en la figura 2. La amilopectina es parcialmente soluble en agua caliente y presencia de yodo que produce un color rojizo violeta (De los Ángeles, 2016).



**Figura 2.** Estructura química de la amilopectina (Badui, 2006)

Arévalo *et al.*, (2018) mencionan que la estructura del almidón contiene aproximadamente 17-27% de amilosa y el porcentaje restante está constituido por la amilopectina, la concentración relativa de estos dos polímeros está regida por factores genéticos de cada cereal, tubérculo, frutas, etc.

### 2.2.1 Fuentes de almidón

Según Ríos (2014) existen dos tipos de fuentes de almidón:

#### a) Almidones de fuentes convencionales

Son llamados así a los cultivos de almidón que comúnmente se obtiene producto de ello, entre los más importantes son el maíz, trigo, arroz y papa. Cuyas ventajas son aplicables en la industria por su capacidad de gelificación, flexibilidad fuerza de adhesión, etc. Y las desventajas es que son utilizadas directamente como alimento, por lo que su precio de venta es mayor y su disponibilidad está en riesgo.

## **b) Almidones de fuentes no convencionales**

En los últimos años se ha extraído almidón de fuentes no muy comunes tales como el makal (*Xanthosoma yucatonensis*), camote (*Ipomea batata*), mandioca (*Manihot esculenta*) y el sagú (*Marantha arundinacea*) entre otros más en diferentes países. Esta búsqueda de fuentes alternas de almidón se da por las siguientes razones:

- Satisfacer la demanda en las industrias que tiene como materia prima el almidón.
- Buscar almidones con propiedades funcionales tecnológicas diferentes o mejores a las convencionales.
- Tratar de resolver dificultades en producción de alimentos debido a factores de productividad de la degradación de la tierra y problemas de riego.

### **2.2.2 Almidón de mandioca (*Manihot esculenta*)**

#### **2.2.2.1 Generalidades**

La mandioca (*Manihot esculenta*), mejor conocida por sus nombres comerciales mandioca o cassava, es originaria del trópico sudamericano. Este tubérculo es considerado como uno de los principales productos alimenticios después del trigo y arroz (Laurent y Argüello, 2001).

#### **2.2.2.2 Descripción botánica y taxonómica**

La mandioca (*Manihot esculenta*) tiene múltiples centros de origen, muchos sugieren que los cultivos fueron originados en el extremo sur de la Amazonia brasileña (Léotard *et al.*, 2009; Olsen y Schaal, 1999). El arbusto perenne leñoso, que crece de 1 m a 5 m de altura; ha sido cultivada principalmente por sus raíces almidonadas por casi 9000 años, convirtiéndola en uno de los alimentos más antiguos de la agricultura; ya que su cultivo se adapta a ecosistemas



adversos y climas marginales (Howeler *et al.*, 2013). En la figura 3 se muestra la planta de la mandioca y en la tabla 1, se detalla la taxonomía de este tubérculo.



**Figura 3.** Planta de mandioca (A) y raíz de mandioca (B) (Suárez y Meredos, 2011).

**Tabla 1.** Taxonomía de la mandioca (Hillocks, Thresh y Bellotti, 2002)

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Euphorbiales</i>
Familia	<i>Euphorbuaceae</i>
Especie	<i>Manihot Mills</i>
Nombre binomial	<i>Manihot Esculenta Crantz</i>

En la tabla 2, se muestran los porcentajes de amilosa y amilopectina de los almidones más comunes y el tamaño del gránulo de los almidones.

**Tabla 2.** Composición de almidón de mandioca con otros tubérculos (FAO, 2007)

<b>Tipo</b>	<b>Características de algunos almidones comunes</b>		
	<b>Amilosa (%)</b>	<b>Amilopectina (%)</b>	<b>Tamaño (µm)</b>
Maíz	23	73	5-25
Papa	22	78	5-100
Mandioca	18	82	5-35
Sorgo	0-1	99-100	5-45
Trigo	24	76	11-41
Oca	29	71	20-29
Pituca	18-25	72-83	4-11

#### **2.2.2.3 Distribución geográfica**

La mandioca es un tubérculo que tiene una extensa distribución geográfica alrededor del mundo, la cual se ha desarrollado ampliamente en el área de los trópicos americanos (Venezuela y Colombia), hasta el noreste de Brasil, expandiéndose hasta los continentes de África y Asia. En la actualidad los cultivos de mandioca se encuentran en las zonas andinas de Latinoamérica (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017).

#### **2.2.2.4 Usos**

Las principales ventajas de acuerdo a los usos de la mandioca, es la producción de carbohidratos debido a su alto contenido de almidón, la cual se usa en más de 300 productos industriales. Asimismo, el almidón tiene mucha demanda para la industria alimentaria y no alimentaria (OMS, 2009).

En la agroindustria, el almidón de mandioca se usa para producir adhesivos de bajo costo y para prensar la madera, pero también en la elaboración de productos farmacéuticos, papel, textiles, cervecería y cosméticos (Arenas, 2006).

#### **2.2.2.5 Producción**

La producción de la mandioca ha crecido drásticamente en la agricultura mundial. La cosecha del 2011 alcanzó niveles récord, gracias a la expansión del comercio mundial de productos de mandioca y al fuerte crecimiento de la producción en África-Nigeria (Howeler *et al.*, 2013).

El Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI, 2017) reporta que la producción nacional de mandioca es 60,5 mil toneladas en el 2017, ocupando el puesto número cuatro en la producción de raíces y tubérculos en el Perú.

### **2.3 Arcilla bentonita**

Los minerales de arcilla consisten en pequeñas partículas cristalinas con láminas tetraédricas de sílice-oxígeno y una lámina octaédrica de aluminio o magnesio, donde un ion de aluminio o magnesio se coordina octaédralmente con seis oxígenos o hidroxilos (Salam, Kosa y Al-Beladi, 2017).

La bentonita es un importante mineral comercial compuesto principalmente por un grupo de esmectitas de minerales de arcilla. Tiene amplias áreas de aplicación tales como lodo de perforación o gel de perforación, arena de moldeo por fundición, industria de granulación de alimentos, sellado de estanques de agua dulce, aguas residuales y lagunas de agua industrial, fungicidas, aerosoles, limpiadores, abrillantadores, materiales cerámicos, papel, cosméticos y medicamentos, y aplicaciones donde se requieran sus propiedades únicas de adhesión, suspensión o gelificante (Uskarci, 2006).

### 2.3.1 Montmorillonita (MMT)

La montmorillonita es el principal componente de la bentonita, derivado de la intemperie de la ceniza volcánica, que puede expandir su volumen original cuando entra en contacto con el agua.

Las montmorillonitas orgánicamente modificadas son conocidas también como arcillas orgánicas y organoarcillas, materiales consistentes en silicatos minerales de capas en dimensión nanométrica, que son baratos, no peligrosos, y se caracterizan por una alta reactividad superficial y estabilidad debido a su gran superficie (Salam, Kosa y Al-Beladi, 2017), las organoarcillas se sintetizan injertando tensioactivos catiónicos [26-29] (como los compuestos de amonio cuaternario  $[(CH_3)_3NR]^+$  o  $[(CH_3)_2NRR']^+$  donde R y R' son hidrocarburos alquílicos o aromáticos, etc.) sobre minerales de arcilla. La distancia interlaminar del plano d001 de la arcilla que no se ha modificado orgánicamente, es relativamente pequeño, y el entorno de la capa intermedia es hidrófilo. La intercalación de surfactante orgánico entre capas de arcillas no solo los cambia de hidrofílicos a hidrofóbicos, sino que también aumenta considerablemente el espaciado basal de las intercapas.

Las industrias que trabajan con envases suelen utilizar este compuesto por su disponibilidad y excelentes propiedades de barrera al vapor de agua y gases, al interactuar con un biopolímero es muy compatible, mejorando significativamente las propiedades mecánicas y térmicas de una matriz; su estructura estratificada única y sus altas capacidades de intercalación les permiten ser modificado químicamente para ser compatible con polímeros, lo que también los hace particularmente atractivos en el desarrollo de nanocompuestos poliméricos a base de arcilla (Assaedi, Shaikh y Low, 2016; Zeng, Yu, Lu y Paul, 2005). Las organoarcillas ha ganado importancia sobre otras arcillas orgánicamente modificadas, debido a su abundancia, es amigable con el medio ambiente y bien estudiada químicamente, además su efecto reforzador del MMT, también se lo considera como una capa rígida e impermeable, crea una estructura de laberinto

cuando se dispersa en polímeros, fuerza a los gases y vapores en movimiento, a seguir un camino tortuoso, y finalmente reduce su tasa de permeación (Arora y Padua, 2010; Azeredo, 2009).

Por lo tanto, los beneficios pueden incluir una mayor resistencia mecánica, menor permeabilidad a los gases, mayor resistencia al fuego y en las propiedades de rendimiento que solo podrían reconocerse en dispersión a nanoescala; aunque la alta relación de aspecto de la nanoarcilla es ideal para el refuerzo, las capas de nanoarcilla no se dispersan fácilmente en la mayoría de los polímeros debido a su aglomeración energética preferida, para lograr la dispersión a nanoescala, la delaminación y la exfoliación de estas plaquetas un requisito previo es ver si hay afinidad entre el nanocompósito y la matriz polimérica, las cadenas de polímero se intercalan a las galerías de arcilla y las deslaminadas. Sin embargo, la mayoría de los polímeros basados en petróleo no son compatibles con los minerales de arcilla debido a las diferencias en sus energías superficiales; y la exfoliación de plaquetas de arcilla es uno de los principales problemas encontrados al preparar nanocompuestos (Kádár *et al.*, 2006).

### **2.3.1.1 Organoarcilla**

El término "organoclays" denota una familia de materiales hidrófobos, obtenidos modificando arcillas y minerales de arcilla con varios compuestos orgánicos a través del proceso de intercalación e injerto de superficie. Organoarcillas (OA) ha encontrado aplicaciones prácticas importantes, especialmente como adsorbentes de contaminantes orgánicos y como componentes en la formación de nanocompuestos de polímeros de arcilla (Bergaya, Lagaly y Vayer, 2013).

Poseen superficies hidrófilas e hidrófobas, así como una gran porosidad y área de superficie, estos materiales son potencialmente útiles como adsorbentes de compuestos orgánicos volátiles (COV), así como de contaminantes orgánicos e inorgánicos en aguas residuales (Bouberka *et al.*, 2009).

El procedimiento más común utilizado para preparar Mt organófilos y otros minerales arcillosos es la reacción de intercambio catiónico con un amonio cuaternario.

## **2.4 Tecnología de procesamiento para biopelículas**

El desarrollo y aplicaciones de biomateriales como envases biodegradables están dirigidos a las formulaciones de almidones, proteínas (gelatina, proteína de soja, proteínas miofibrilares, colágeno, etc.), también se ha sugerido el uso de materiales compuestos o mezclas de estos (Souza, 2001).

Las técnicas de elaboración de películas a partir de estas materias primas son también diversas, siendo las más utilizadas, "casting" y extrusión.

### **2.4.1 Tecnología por extrusión termoplástica**

Método usado en la elaboración de películas biodegradables, que utiliza una sola etapa de alta velocidad de procesamiento. Proceso que envuelve fuertemente un material a través de matrices a condiciones controladas, nos ofrece ventajas sobre los métodos tradicionales conocidos por la industria (Herald, Obuz, Twombly y Rausch, 2002). La materia prima a utilizar deberá ser gelatinizado empleando calor usando el método de extrusión con presencia de pequeñas cantidades de glicerol (Sonaka, 2007).

### **2.4.2 Tecnología por método casting**

El método "casting" en la obtención de biopelículas, consiste en la deshidratación de la solución filmogénica (SF) en agua destilada con uso de glicerol (plastificante) y el uso de un antioxidante en la película final. Esta solución se aplica convenientemente en placas petri, controlando el diámetro de la película con una pipeta dejando fluir la solución y evitando la formación de burbujas; con la finalidad de tener una espesura determinada (Araujo, 2008).

Investigaciones reportadas por Vargas *et al.*, (2008) y Thiré *et al.*, (2003), indican que el espesor de los revestimientos, está directamente relacionada con su obtención por vía casting, que permiten tener placas niveladas fácilmente de medir.

## **2.5 Plastificantes**

Sustancias pequeñas con alto punto de fusión y baja volatilidad, más usados en la elaboración de películas o recubrimientos a base de polímeros con el fin de ablandarlos, aportando de este modo mayor flexibilidad (Martins De Sousa, 2012). Entre los plastificantes más usados son el glicerol, sorbitol o una mezcla de estos dos añadidas en la solución filmogénica; Mathew y Dufresne, (2002) argumentan que el glicerol es el plastificantes más usado comúnmente en la obtención de un película a base de almidón. Estos plastificantes por ser moléculas pequeñas son fácilmente acoplados entre las cadenas poliméricas debido a su habilidad en reducir la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas, causando un aumento de volumen libre o la movilidad molecular del polímero. Al añadir un plastificante a una película generan cambios en sus propiedades físicas, químicas y mecánicas.

Según Martins De Sousa (2012) los principales efectos de los plastificantes sobre el tratamiento de la obtención de biopelículas son:

- Reducir las fuerzas intermoleculares entre las cadenas.
- Aumentar la movilidad y facilitando el deslizamiento entre las cadenas de los polímeros.
- Reducir las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) y de fusión ( $T_m$ ).
- Modificar las propiedades de barrera y mecánicas de los biopelículas.

## **2.6 Antimicrobiano**

Los aceites esenciales son los responsables de la mayoría de los olores y sabores de las plantas, fueron utilizados desde la antigüedad por el hombre y actualmente tiene una gran importancia en la industria cosmética, alimentaria como en los condimentos, saborizantes y conservantes y en la industria farmacéutica como antimicrobiano u antifúngicos (Lubbe y Verpoorte, 2011).

El romero es un arbusto que pertenece a la familia de las *Lamiáceas*, sus condiciones óptimas de altitud está entre 0 a 3000 msnm, con precipitación anual de 250 a 2500 mm, con un pH de suelo 4,5 a 8,7 puede crecer en suelos arenosos, secos, pedregosos teniendo un buen drenaje para su cultivo (Ramos, 2013).

Estudios realizados en Turquía encontraron que los aceites esenciales de romero poseen actividad antimicrobiana y antioxidante (Ojeda *et al.*, 2013). El empleo de aceite esencial principalmente por su efecto antioxidante, se debe a que están conformados por una gran cantidad de compuestos de diferente naturaleza; algunos informes sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero muestran que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (Campo, Del Campo, Amiot y Nguyenthe, 2000), donde se necesitó un total de 0,5 % de extracto de romero para inhibir *Staphylococcus aureus* a 30 °C, mientras que 0,13 % inhibió la bacteria a 10 °C. *Listeria monocytogenes* se inhibió con 0,25 % de extracto de romero a 48 °C, mientras que de 0,5 a 1 % fue necesario a 30 °C.

Actúa como un indicador de la calidad de los alimentos y la vida útil, usado como antimicrobiano, que debe ser activo en las condiciones fisicoquímicas específicas de los alimentos a bajas temperaturas 4 y 10 °C en comparación con 30 °C.

Estudios reportados por Fu *et al.*, (2007) proporcionan evidencia de que el aceite esencial de romero y clavo, representan una fuente potencialmente rica de medicamentos y conservantes de alimentos contra microorganismos; mostraron actividad inhibitoria para *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## **2.7 Emulsionante**

La goma arábiga (GA) o goma ocácia, es la savia exudada de varias especies de árboles de la Acacia, químicamente es una sal neutra o levemente ácida; está formado por seis



carbohidratos: galactosa, ramnosa, arabinopiranososa, arabinofuranosa, ácido glucourónico y ácido metilglucourónico (Pasquel, 2001).

GA es un biopolímero comúnmente utilizado en emulsiones, cuyas características que proporciona como un efectivo emulsionante se debe a su alta solubilidad en agua, baja viscosidad, buena actividad superficial y la habilidad de formar películas protectoras. Esta produce películas con las propiedades de un hidrocoloide y puede formar emulsiones estables con la mayoría de aceites lo que favorece el control del balance hidrofílico - lipofílico (BHL) (Chanamai, McClements, 2001).

Un estudio reportado por Ochoa *et al.*, (2013) realizaron películas comestibles a base de biopolímeros (pectina, goma arábica y goma xantana), cera de candelilla y aceite de jojoba en pimienta verde; la mejor película obtenida fue a base de goma arábica, ya que presentó menos daños en la apariencia y prolongando la vida útil del alimento en comparación con las otras películas.

## **2.8 Técnicas de caracterización**

### **2.8.1 Propiedades mecánicas**

Las películas de almidón deben ser resistentes a las rupturas y al desgaste para que puedan proteger al alimento y facilitar su manipulación. Las propiedades mecánicas dependen de la técnica de formación de la película y de su estructura cohesiva que son las conexiones moleculares entre las cadenas de los polímeros impidiendo su ruptura (Mali *et al.*, 2002 y Mali *et al.*, 2010).

La incorporación del plastificante contribuirá a la flexibilidad, sin embargo reduce su resistencia mecánica, para ello es necesario determinar la influencia de las fuerzas mecánicas externas a través de ensayo tensión-deformación que dependerá de la espesura y de las características inherentes del material (Mali *et al.*, 2005).

Las propiedades mecánicas a evaluar:

**a) El módulo de Young (MPa)**

Es la relación entre la tensión de tracción y la deformación en la región elástica, en la que la respuesta del cuerpo de prueba al estiramiento es creciente y linealmente proporcional a la tracción impuesta; es un indicador de rigidez de una película (Borda, 2008).

**b) Elongación o estiramiento (%)**

Método que mide la capacidad de cambio de longitud de la biopelícula antes de romperse. Será determinada mediante el porcentaje de elongación que definirá su flexibilidad (Wang *et al.*, 2007 y Borda, 2008) (Ec. 1).

$$\varepsilon (\%) = \frac{D_f - D_i}{D_i} \times 100 \dots\dots\dots (Ec.1)$$

Donde  $\varepsilon$  (%) es el alargamiento porcentual,  $D_f$  distancia de alargamiento hasta la ruptura (mm) y  $D_i$  distancia inicial entre las líneas de referencia (mm).

**c) Fuerza de Corte o tensión de ruptura (MPa)**

Determina la resistencia máxima a la ruptura o desgarro de la biopelícula (Wang *et al.*, 2007 y Borda, 2008), mediante la siguiente ecuación:

$$T_s (MPa) = \frac{F}{A} \dots\dots\dots (Ec.2)$$

Donde F es la fuerza máxima de ruptura y A el área de sección transversal de las películas, obtenido al multiplicar el ancho y el espesor promedio de las tiras de película.

**2.8.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

La estructura del plástico se encuentra ligadas con la composición y proceso de formación de los materiales, siendo estas las principales determinantes de sus propiedades. La metodología más empleada en la caracterización de materiales es la microscopía electrónica de barrido, debido

a sus características permite el estudio de estructuras superficiales o internas. Las imágenes tienen alta profundidad de enfoque, que significa la obtención de diferentes relieves de la superficie, imágenes tridimensionales, por lo tanto, más fácil de interpretar que las imágenes de proyección de la microscopía de transmisión; imágenes de alta resolución (Canevarolo, 2003; Martins De Sousa, 2012).

### **2.8.3 Difracción de rayos X (DRX)**

Es un método utilizado principalmente para detectar presencia de distintas fases cristalinas que están presentes en la muestra y otros rasgos microestructurales (Maximow, 2008).

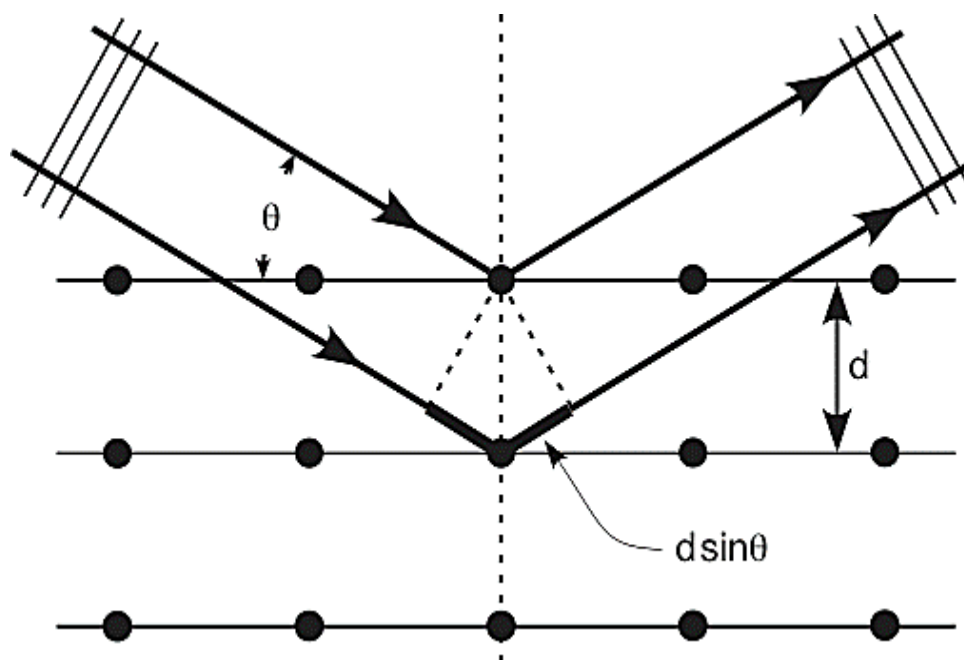
Este análisis se realiza para distinguir los tipos de patrones de la estructura cristalina de los gránulos de almidón. Los patrones de tipo A provienen de almidones de cereales, el tipo B son de almidones de tubérculos y los de tipo C son de almidones de raíces y semillas. Los Rayos-X se realizan bajo un ángulo que muestra las regiones amorfas y cristalinas del gránulo de almidón. La región amorfa está constituido esencialmente por amilosa, mientras que la región cristalina está formada por cúmulos paralelos a cadenas cortas en la amilopectina también presenta regiones amorfas y regiones cristalinas; al ser sometidas a la acción de calor el almidón y película experimenta cambios físicos y químicos (Rodríguez, San Martín y Gonzáles, 2001).

La difracción de rayos X y su relación con el medio cristalino en que se produce son determinadas por la ley de Bragg, lo cual determina un valor único y exacto del ángulo de incidencia para el que tiene lugar la reflexión del haz. El físico inglés Bragg (Bragg, 1969) dio una explicación al fenómeno de la difracción de rayos X por un sólido cristalino que, aunque pueda parecer artificiosa, proporciona una visión muy simple e intuitiva (Sanz, 1995).

La ley de Bragg es representado por la siguiente ecuación:

$$2d \operatorname{Sen} \theta_g = n \lambda \dots\dots\dots (Ec.3)$$

Donde  $\theta_g$  es el ángulo de Bragg,  $n$  se denomina orden de la reflexión y  $2d$  la distancia que hay de un plano a otro.



**Figura 4.** Representación gráfica de la ley de Bragg (Sanz, 1995).

#### 2.8.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El DSC es un instrumento que mide la energía absorbida o liberada por un material durante la transición de fase ambos están sujetos a una temperatura controlada; una curva de DSC proporciona la variación de entalpía en función del tiempo o la temperatura (Pampa, 2007).

Calorimetría diferencial de barrido se usa para monitorear los cambios en la energía térmica asociados con las transformaciones físicas y químicas de los materiales como función de la temperatura. Por ejemplo, transiciones de una estructura cristalina a una estructura amorfa en un sólido, reacciones químicas, etc. En ambas transformaciones calor es liberado o absorbido (Rodríguez, San Martín y González, 2001).

Obteniendo el diagrama de flujo de calor y temperatura, el cálculo de la entalpía para una transición térmica viene dado según las siguientes ecuaciones.

El flujo de calor liberado es equivalente al cambio de entalpía, ya que el ensayo es realizado a presión constante, según se muestra en la ecuación 4:

$$\left(\frac{dQ}{dt}\right) p = \frac{dH}{dt} \dots\dots\dots(Ec.4)$$

Integrando luego, respecto al tiempo se tiene:

$$\int \left(\frac{dQ}{dt}\right) p dt = \Delta H \dots\dots\dots(Ec.5)$$

Teniendo en consideración un aumento lineal de temperatura y tomando un diferencial de tiempo se tiene:

$$T = K x t$$

$$dt = \left(\frac{1}{K}\right) x dT \dots\dots\dots(Ec.6)$$

Uniendolo la ecuación 5 y 6 se tiene:

$$\left(\frac{1}{K}\right) x \int \left(\frac{dQ}{dt}\right) p dT = \Delta H \dots\dots\dots(Ec.7)$$

Esta última ecuación indica que el cambio de entalpía en una transición térmica es directamente proporcional al área bajo la curva en la gráfica de flujo de calor vs temperatura, siendo la constante de proporcionalidad, el valor inverso del ratio de calentamiento programado para el ensayo.

### 2.8.5 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Según Sobral (2000) PVA es la tasa de transmisión de vapor de agua a través de la unidad de área del material plano, a un determinado espesor, bajo condiciones de temperaturas definidas.

Tener conocimiento de la PVA es muy importante pero no es una propiedad restrictiva, un material muy permeable como las películas de almidón es el indicado para embalajes de vegetales frescos, mientras que una película poco permeable es mejor en productos deshidratados. En las películas hidrofílicas, la actividad de agua ( $A_w$ ) y la temperatura ( $T^\circ$ ) a la que se somete influye en las propiedades de barrera que protege a la película de la absorción de  $CO_2$  y  $O_2$  y al ser aumentada la temperatura la PVA y va a depender de la humedad de la materia prima inicial (Mali *et al.*, 2010 y Vicentini, 2003), lo que se ve definido en la siguiente ecuación:

$$PVA = \text{Permeanza} \times \text{espesor} \dots\dots\dots(\text{Ec.8})$$

Donde:

PVA = permeabilidad al vapor de agua, (g mm/h m<sup>2</sup> KPa)

## **CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Lugar de ejecución**

El presente trabajo fue desarrollado en los laboratorios del Centro de Investigación Tecnológico de Alimentos (CITAL), Centro de Investigación de Ciencia en Alimentos (CICAL), Ciencias químicas y Laboratorio de Procesos, pertenecientes a la EP de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Peruana Unión y en los laboratorios de Nanomateriales de la Universidad Nacional de Trujillo y la Universidad Nacional de Ingeniería; y el laboratorio de Investigación de la facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

### **3.2 Materiales e insumos**

#### **3.2.1. Materia prima**

- Mandioca (*Manihot esculenta*) fue adquirida en el mercado mayorista de la provincia de Cañete del departamento de Lima.
- Bentonita sódica purificada, adquirido en PROMART.

#### **3.2.2. Insumos**

- Aceite esencial de Romero marca SATVYKA.
- Glicerol, adquirido marca FRUTELLO.
- Goma arábica marca POLIFOOD PERÚ.

#### **3.2.3. Materiales**

- Matraces de Erlenmeyer de 125 ml.
- Vaso precipitado de 50 ml, 100 ml y 600 ml
- Pipetas de 1ml, 2ml, y 10 ml.
- Probeta de 100 ml.

- Placas petri medianas.
- Varillas.
- Tubos de ensayo de 7 ml y 20 ml.
- Propipetas.
- Fiolas de 50 ml.
- Morteros de porcelana.
- Tamicez 150 um.
- Crisoles.
- Gradillas.

#### **3.2.4. Equipos**

- Balanza analitica (Marca: PIONNER / Modelo: Ítem PA21).
- Centrifuga (Modelo H-2050R).
- Estufa digital (Marca: MMM ECOCELL / Modelo 25195).
- Secador de bandejas (Marca: MEMMERT / Modelo D91107).
- Baño maria (Marca: MEMMERT / Modelo WNW 10 / Serie L311005).
- Microscopio electronico de barrido (Marca: ZEISS / Modelo EVO MA10).
- Multicalorimetro diferencial de barrido (Modelo: TA Instrumentos).
- Agitador orbital (Marca: ELMi / Modelo: Shaker S-3).
- Difractometro (DR-X) (Marca: BRUKER / Modelo: D8 Advance).
- Agitador (Marca: SILVERON / Modelo: LMS-A).
- Incubadora (Marca: BIDER).
- Texturometro ( Modelo: TA XT Plus).
- Licuadora (Marca: Oster).
- Termómetro.



### **3.2.5. Reactivos**

- Hidroxido de sodio
- Cloruro de calcio
- Etanol
- Lugol

## **3.3 Metodología**

### **3.3.1. Almidón**

#### ***3.3.1.1. Extracción del almidón de mandioca (Manihot esculenta)***

##### **a) Extracción vía tecnología húmeda**

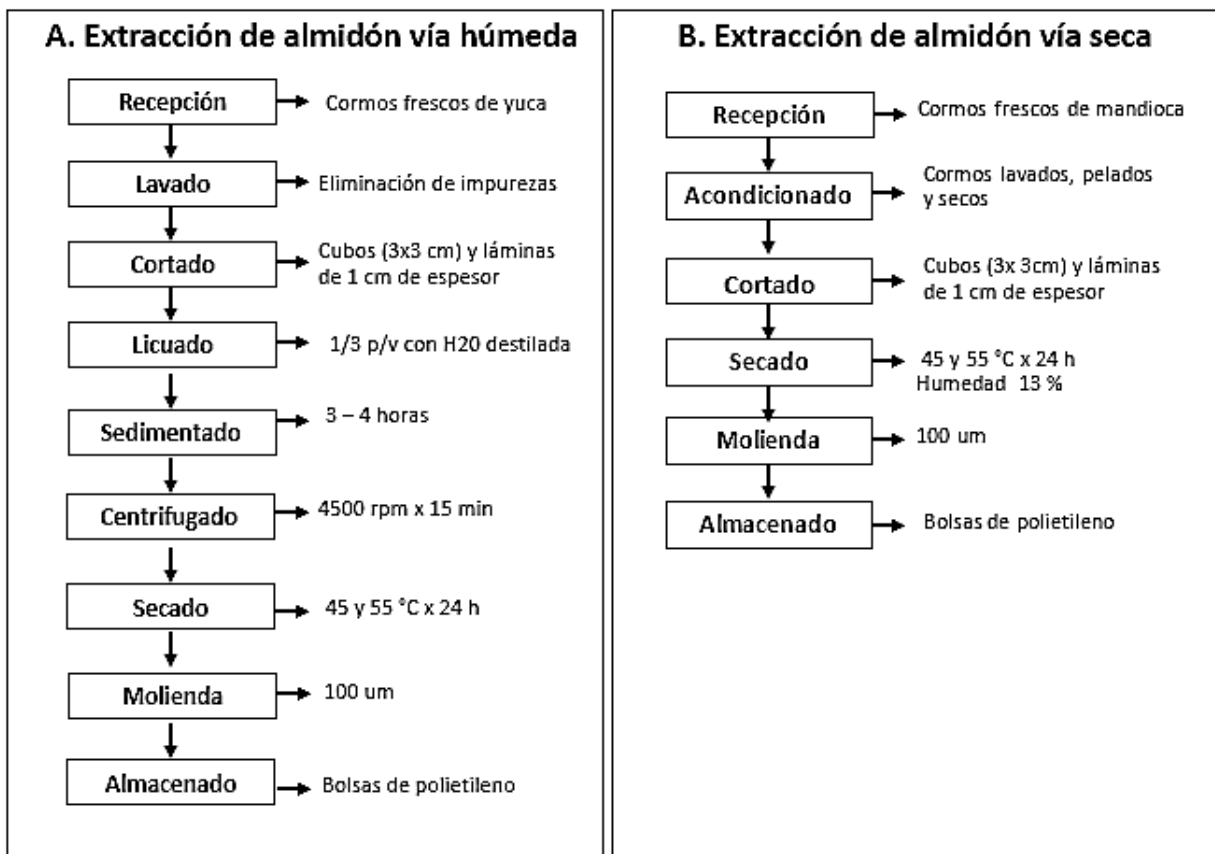
La extracción de almidón nativo se basó a la metodología de Torres, Montero y Duran (2013). Las raíces de mandiocas fueron recepcionadas frescas, fueron lavadas eliminando las impurezas que se encontraban en la cáscara con la ayuda de agua potable; luego se procedió a cortar en formas de láminas y cubos de 1,0 cm de espesor aproximadamente, seguidamente se trituraron en una licuadora a 650 rpm por 3 minutos con agua destilada en una proporción de 1:3 p/v. Esta solución se filtró en una tamiz 125  $\mu\text{m}$  y la fibra retenida se eliminó. El filtrado fue sometido a centrifugación durante 15 min a 3500 rpm. Cuando se observó la separación de fases, el sobrenadante se eliminó.

Todos lo extraído se lavaron 3 veces con agua destilada hasta que la lechada quedó limpia. Posteriormente el almidón recuperado se procedió a secar en una estufa a 45 y 55 °C por 24 horas. Después se realizó una molienda en morteros de porcelana y fue tamizado a 150  $\mu\text{m}$ . Por último el almidón de mandioca obtenido se almacenó en bolsa de polietileno con cierre hermético hasta su posterior análisis y utilización.

## b) Extracción vía seca

Fue empleado la metodología de Ramírez, (2007). Las raíces de mandiocas fueron recepcionadas frescas, después fueron lavadas eliminando la tierra e impureza que se encontraban en la cáscara con la ayuda de agua potable; luego se procedió a cortar en formas de láminas y cubos de 1 cm de espesor aproximadamente, después fueron secados con aire caliente en un secador de bandejas, en a 45 y 55 °C hasta alcanzar 13 % de humedad, luego se procedió a triturar en morteros de porcelana, después se realizó una molienda en morteros de porcelana y fue tamizado a 150  $\mu\text{m}$ . Por último el almidón de mandioca obtenido se almacenó en bolsa de polietileno con cierre hermético hasta su posterior uso.

En la figura 5 se muestra los flujogramas de los dos tipos de extracción de tecnológicas almidón de mandioca.



**Figura 5.** Tipos de extracción tecnológica de almidón A) vía húmeda B) vía seca

### 3.3.1.2. *Determinación las propiedades fisicoquímicas, funcionales, morfológicas y térmicas del almidón nativo.*

#### A. **Caracterización fisicoquímico de almidón**

Se determinó de acuerdo a los métodos oficiales descritos por la AOAC (2005), comprendiendo los siguientes análisis: humedad (método 925.10), proteína cruda (1920.152), grasa cruda (método 920.39), fibra cruda (método 985.29), cenizas (método 923.03) y carbohidratos determinado por diferencia.

La determinación de amilosa y amilopectina se realizó con el método de Anchundia *et al.*, (2016), descrito en el anexo 1.

#### B. **Caracterización funcional de almidón**

##### a) **Poder de hinchamiento (PH) e índice de solubilidad de agua (ISA)**

En los tubos de centrífuga previamente tarados, se preparó 40 ml de suspensión de almidón al 1 % (p/v) a base seca; los tubos fueron incubados en baño maría, por 30 minutos a 60 °C. Después del tiempo transcurrido las muestras fueron retiradas de baño maría para ser centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó y se pesó los gránulos hinchados. Del sobrenadante se tomó 10 ml de muestra que fueron secados en una estufa a 120 °C durante 4 horas. Por último transcurrido el tiempo se sacaron la muestra y se dejó enfriar en un desecador (Ríos, 2014). A continuación se presenta la ecuación para determinar PH e ISA (Ec. 9 y 10):

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Peso del almidón soluble} \times 400}{\text{Peso de la muestra (b.s)}} \dots\dots\dots (\text{Ec. 9})$$

$$\text{Poder de hinchamiento} \left( \frac{\text{g agua}}{\text{g almidón}} \right) = \frac{\text{Peso de sedimentado} \times 100}{\text{Peso de la muestra (b.s)} - (100 - \% \text{ solubilidad})} \dots\dots\dots (\text{Ec. 10})$$

## **b) Índice de absorción de agua (IAA)**

La capacidad de absorción de agua se determinó por el método actualizado por Aristizábal y Sánchez, (2007); Rodríguez-Sandoval, Lascano, y Sandoval, (2012). Se prepararon 40 mL de una suspensión de almidón al 1% (b.s), en agua destilada a 30 °C. Se calentaron a una velocidad de 1,5 °C/min hasta alcanzar 60 °C y se mantuvieron a esas temperaturas durante 30 minutos con agitación. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 2500 rpm, durante 15 minutos. El gel resultante se pesó, la capacidad de absorción de agua para cada temperatura se calculó como el peso (g) del gel por g de muestra seca (Ec. 11).

$$\text{Indice de adsorción de agua (IAA)} = \frac{\text{Peso de gel (g)}}{\text{Peso muestra (g)(b.s)}} \dots\dots\dots (\text{Ec. 11})$$

## **C. Propiedades morfológicas del almidón**

### **a) Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Las muestras se fijaron en tiras de aluminio con cintas de doble cara (cinta conductora de carbono). Finalmente se observaron en el microscopio electrónico de barrido (Pelissari, 2013).

## **D. Propiedades térmicas del almidón**

### **a) Temperatura de Gelatinización**

Para determinar la temperatura de gelatinización se utilizó dos técnicas:

La primera técnica se utilizó la metodología de Aristizábal y Sánchez (2007), donde se pesó 10 g de almidón de mandioca para disolver en agua destilada y completar a 100 ml, después se separó 50 ml de la muestra y se introdujo a baño maría a 85 °C. Se agitó constantemente la suspensión de almidón hasta que se formó una pasta cremosa y la temperatura permanezca estable, se apunta la temperatura de gelatinización.

La segunda técnica se realizó en un Multicalorímetro diferencial de barrido (MCDSC), en el mejor tratamiento para el desarrollo de la biopelícula. Se evaluó con el método propuesto

por Lin *et al.*, (2013) con ligeras modificaciones. Se pesó 20 mg de muestra (base seca) en una cápsula de aluminio, después se mezclaron con 60 ml agua destilada, y se dejó en reposo por 1 hora a temperatura ambiente antes de realizar el análisis. La muestra de almidón se calentó de 25 °C a 130 °C a una velocidad de calentamiento 2 °C por minuto. Se determinó temperaturas de inicio ( $T_o$ , °C), pico ( $T_p$ , °C) y final ( $T_f$ , °C).

#### **b) Entalpía de gelatinización**

Se determinó con el equipo Multicolorímetro diferencial de barrido utilizando la metodología de Lin *et al.*, (2013), se midió la entalpía ( $\Delta H$ , J/g b.s.).

### **3.3.2. Organoarcilla**

#### **3.3.2.1. Modificación y caracterización de la organoarcilla**

Para la obtención de la organoarcilla se utilizó la metodología basado en los trabajos realizados por Perugachi, (2006). Se preparó en una probeta 1 L, 100 g de bentonita natural previamente secada; se adicionó 700 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente hasta que se homogeneizó y luego se aforó y se dejó reposar 30 minutos. Después se extrajo de la solución 400 ml de sobrenadante, luego la solución extraída se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos y se secó a 100 °C por 12 horas, transcurrido el tiempo de secado se realizó la molienda para su posterior modificación orgánica.

Se preparó 600 ml de una solución agua/etanol (4/1, v/v) calentado a 60 °C, después se adiciono 7,5 de arcilla purificada dentro de la solución y fue agitada por 2 horas a 60 °C. Luego se agregó 10 g de sales cuaternarios de amonio (Arquard HTL8-MS), agitando hasta que se logró un completa homogeneización; después se mezcló durante 1 hora en un procesador ultrasónico. Se mezcló en un agitador orbital por 12 horas a 60 °C, de la muestra resultante se eliminó el sobrenadante siendo lavado con solución agua/etanol (1/1, v/v). Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm a 10 minutos, el precipitado se secó a 100°C por 12 horas y finalmente se realizó la

molienda y se almacenó la organoarcilla en bolsa de polietileno con cierre hermético hasta su posterior uso.

Para la caracterización de la organoarcilla se utilizó el difractor, 40 Kv de tensión y corriente de 30 mA. Se recogieron los datos en un rango angular de 5 a 70 ° (2θ), a una velocidad de exploración de 1,2 °/min. La cristalinidad relativa (%) de la película se estimará cuantitativamente como la relación del área cristalina al área total (Nara y Komiya, 1983).

Se utilizó la ley de Bragg para determinar los picos cristalinos utilizando la ecuación 12.

$$2d \operatorname{Sen} \theta_g = n \lambda \dots\dots\dots (Ec.12)$$

Donde  $\theta_g$  es el ángulo de Bragg,  $n$  se denomina orden de la reflexión y  $2d$  la distancia que hay de un plano a otro.

### **3.3.3. Biopelícula**

#### **3.3.3.1. Preparación de la biopelícula activa**

Se pesó las cantidades de los insumos de acuerdo a las formulaciones (Tabla 5 y 6), luego se procedió a mezclar el almidón con 100 ml de agua, partes por cien (g/100g) destilada en un vaso precipitado utilizando un baño maría, habiendo llegado a la suspensión gelatinizada, se agregó el emulsionante (goma arábiga), organoarcilla y plastificante (glicerol), con una agitación continua (Anexo 4), durante su enfriamiento a temperatura 25 °C se agregó aceite esencial de romero como agente antibacteriano. Se realizó la solución filmogénica por proceso tecnológico de casting en superficies planas 24 x 37,5; se esparció 400 ml de la solución secado a 40 °C x 24 h en la estufa digital hasta su evaporación peso constante. Finalmente se almacenó a 22 °C y 60 %HR (Villamán, 2007).

### 3.3.3.2. *Caracterización de la biopelícula activa*

#### **a) Propiedades mecánicas**

Las propiedades mecánicas de las biopelículas se determinaron con un equipo universal (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, England). Para cada tratamiento, se cortaron muestras rectangulares (25 mm por 100 mm). Éstas se montaron en unas pinzas para ensayos de tensión. La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación de la biopelícula fueron 50 y 75 mm\*min<sup>-1</sup> respectivamente. Las curvas fuerza-distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión ( $\sigma$ )-deformación de Henky ( $\epsilon_H$ ) que permitieron obtener los parámetros módulo de elasticidad (EM) y tensión de fractura (TS); los datos fueron tratados en el software EXPONENT (ASTM, 1992).

#### **b) Permeabilidad al vapor de agua (PVA)**

Se realizó por el método ASTM-E96/E96M-2005 utilizando el método desecante para la medición de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) para cada una de las formulaciones, la prueba consistió en utilizar las biopelículas de muestra, de grosor conocido, como cierre de un tubo de ensayo que contiene el desecante (Cloruro de Calcio [CaCl<sub>2</sub>]) luego se colocó las unidades de prueba en una atmósfera controlada, que se compone de un desecador de vidrio con un medidor de humedad relativa y temperatura (termohigrómetro), la humedad relativa se logró agregando silicagel en el fondo del desecador. Cada tratamiento se pesaron periódicamente, hasta alcanzar el peso límite, equivalente al 10 % del peso inicial del desecante; los aumentos de peso se representó gráficamente como una función de tiempo, utilizando regresión lineal, se calculó la pendiente, misma que al dividirse entre el área de la película resultó el WVT (índice de transferencia al vapor de agua).

$$WVT = \frac{Pendiente}{Área} \dots\dots\dots (Ec. 13)$$

Donde:

WVT = índice de transferencia al vapor de agua

Pendiente= diferencia de masa a través de tiempo (Regresión lineal)

A = Área de película expuesta, (m<sup>2</sup>)

La permeanza es el cociente que resulta de la división de WVT entre la presión de vapor de agua a una temperatura dada y la diferencia de las humedades relativas.

$$Permeanza = \frac{WVT}{PA_1} - PA_2 = \frac{WVT}{S(R_1 - R_2)} \dots\dots\dots (Ec. 14)$$

Donde

PA<sub>2</sub> = presión sobre la película , KPa

PA<sub>1</sub> = presión a la cual está sujeta la película al interior de tubo KPa

S = Presión de vapor saturación a la temperatura experimental KPa

R<sub>1</sub> = Humedad relativa de la cámara, en fracción

R<sub>2</sub> = Humedad relativa interna de tubo de prueba, en fracción.

El resultado de la ecuación 14 se multiplica con el espesor de las biopelículas y proporciona la permeabilidad al vapor de agua.

$$PVA = Permeanza \times espesor \dots\dots\dots (Ec. 15)$$

Donde:

PVA = permeabilidad al vapor de agua, g mm/h m<sup>2</sup> KPa



### c) Solubilidad de agua

Se recortó rectángulos de 3x4 cm de los películas y se almacenaron en un desecador por 24 horas. Los pesos de las películas cortadas fueron registradas y posteriormente se colocaron en un vaso precipitado con 100 ml de agua destilada y agitación continua 125 rpm en el agitador orbital por una hora a 50 °C. Después se filtró las piezas de las películas y se secaron en la estufa digital a 60 °C hasta llegar a un peso constante (Arévalo *et al.*, 2018). Luego estas fueron pesadas y por último se determinó el porcentaje de materia soluble (%) el cual se calculó de la siguiente manera (Ec. 16):

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{\text{Peso inicial seco} - \text{peso final seco}}{\text{Peso inicial seco}} \times 100 \dots \dots \dots (\text{Ec. 16})$$

### d) Actividad Antimicrobiana

Se aplicó el método de Hanusova *et al.*, (2012) donde las películas (en disco de un 2cm) fueron puestas en el agar PLATE COUNT AGAR (PCA) inoculando 1/10 p/v de *enterobacterias* y *Staphylococcus aureus* e incubado a 37 °C por 48 horas. La actividad inhibidora se cuantificó por medición del diámetro del disco más el diámetro total.

## 3.4 Diseño estadístico

### a) Extracción de almidón de mandioca .

El modelo del diseño estadístico utilizado en la extracción de almidón fue un arreglo ortogonal Taguchi L<sub>4</sub> (2<sup>3</sup>) con tres variables independientes (tipo de extracción, temperatura de secado y tipo de geometría) y las variables respuesta (temperatura de gelatinización, solubilidad de agua, poder de hinchamiento e índice de absorción de agua) como se describe en la tabla 3 y 4.

**Tabla 3.** Parámetros y niveles del diseño ortogonal taguchi L<sub>4</sub> (2<sup>3</sup>)

<b>Factor</b>	<b>Nivel 1</b>	<b>Nivel 2</b>
<b>Tipo de extracción</b>	Vía Seca*	Vía húmeda*
<b>Temperatura de secado (°C)</b>	45	55
<b>Tipo de geometría</b>	Láminas**	Cubos**

\*Nivel mayor y menos de acuerdo a la concentración de agua (%).

\*\* Nivel mayor y menos de acuerdo al volumen de la geometría.

**Tabla 4.** Diseño ortogonal taguchi para variables independientes y dependientes

<b>Tratamiento</b>	<b>Variables independientes codificadas</b>			<b>Variables dependientes</b>			
	<b>Tipo de extracción</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tipo de geometría</b>	<b>TG (°C)</b>	<b>SA (%)</b>	<b>PH (%)</b>	<b>IAA (%)</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	-	-	-	-
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	-	-	-	-
<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	-	-	-	-
<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	-	-	-	-

TG: Temperatura de gelatinización, SA: Solubilidad de agua, PH: Poder de hinchamiento, IAA: Índice de absorción de agua

### b) Desarrollo de biopelículas activas

Para el desarrollo de las biopelículas activas se empleó el diseño factorial fraccionado 3<sup>3-1</sup> (Montgomery, 1991) que consta de 9 tratamientos. En la tabla 5 se muestran las variables independientes: concentraciones de organoarcillas (g/100g), aceite esencial de romero (g/100g) y almidón de mandioca (g/100g).

**Tabla 5.** Parámetros y niveles del diseño factorial fraccionado (DFF) 3<sup>3-1</sup>

Factores	Unidades	Niveles		
		-1	0	1
<b>Organoarcilla (g/100g)</b>	g/100g	0,2	0,4	0,6
<b>Aceite esencial de romero (g/100g)</b>	g/100g	0,1	0,2	0,3
<b>Almidón de Mandioca (g/100g)</b>	g/100g	5	6	7

Concentración de glicerol se fijó 2 g/100g y goma arábica 1 g/100g .

Las variables respuesta (dependiente): propiedades mecánicas (PM), la permeabilidad de vapor de agua (PVA), solubilidad de agua y actividad antimicrobiana (AA).

**Tabla 6.** Variables independientes y dependientes del diseño factorial fraccionado 3<sup>3-1</sup>

Trat	Variables independientes						Variables dependientes			
	Codificados			Reales						
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Organoarcilla (g/100g)	Aceite (g/100g)	Almidón (g/100g)	PM	PVA	%S	AA
<b>1</b>	-1	-1	-1	0,2	0,1	5	-	-	-	-
<b>2</b>	-1	0	1	0,2	0,2	7	-	-	-	-
<b>3</b>	-1	1	0	0,2	0,3	6	-	-	-	-
<b>4</b>	0	-1	1	0,4	0,1	7	-	-	-	-
<b>5</b>	0	0	0	0,4	0,2	6	-	-	-	-
<b>6</b>	0	1	-1	0,4	0,3	5	-	-	-	-
<b>7</b>	1	-1	0	0,6	0,1	6	-	-	-	-
<b>8</b>	1	0	-1	0,6	0,2	5	-	-	-	-
<b>9</b>	1	1	1	0,6	0,3	7	-	-	-	-

PM: Fuerza de ruptura (MPa) y Elongación (%) AA: *Enterobacterias* (UFC/g) y *S.aureus* (UFC/g)

Los experimentos fueron ejecutados en orden aleatorio y el tratamiento de datos por análisis de varianza y normalidad para comparar el efecto de los tratamientos en la obtención de la biopelícula con relación a las variables dependientes. La variable dependiente ( $Y$ ) se generó en modelos de función lineal, cuadrática e interacción dependiendo al modelo estadístico (Rodrigues y Iemma, 2014)

### **3.4.1 Análisis estadístico**

#### **a) Extracción de almidón de mandioca.**

Los resultados del diseño ortogonal de Taguchi  $L_4$  ( $2^3$ ) fueron analizados en el programa MINITAB versión 18, donde se determinó el análisis de varianza ( $p \leq 0.05$ ) a un intervalo de confianza de 95%, también se realizó Tukey y las gráfica de efecto principal.

#### **b) Desarrollo de biopelículas activas.**

Los resultados del diseño factorial fraccionado  $3^{3-1}$  fueron analizados en el software STATISTICA versión 13.4. Para evaluar el ajuste del modelo de regresión por cada variable dependiente se determinó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la prueba de falta de ajuste.

Se generó el análisis de varianza para establecer los términos del modelo y los factores significativos sobre cada variable (propiedades mecánicas, permeabilidad, solubilidad y actividad antimicrobiana), consiguiendo los valores de los grados de libertad, suma de cuadrados, media de cuadrado, y el P-valor a un intervalo de confianza de 95% ( $p \leq 0.05$ ), también se generaron gráficos de contorno y superficie de respuesta tridimensional estos gráficos fueron usados para mostrar la relación entre la respuesta y los niveles de cada variable independiente.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Almidón

#### 4.1.1. Extracción del almidón de mandioca (*Manihot esculenta*)

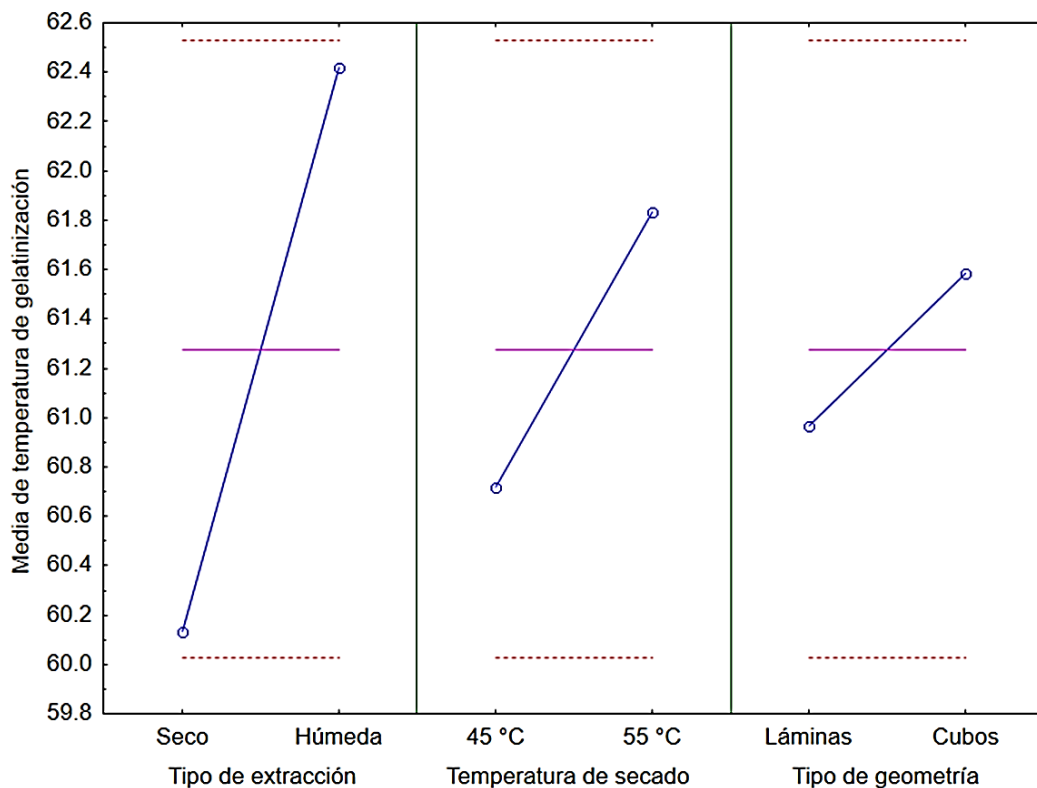
Se analizaron los resultados obtenidos de la aplicación de la metodología Taguchi en el proceso de obtención de almidón de mandioca, tomando como variables independiente el tipo de extracción, temperatura de secado y tipo de geometría, que afecta a la variable de TG, al realizar el anova se observó que influye el tipo de extracción sobre esta variable de respuesta, sin embargo la temperatura de secado y geometría no influyó como muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Propiedades funcionales y analisis de varianza del almidón de mandioca

Tratamiento	TG (°C)	SA (%)	PH(%)	IAA (g gel/g m)
1	59,60 ± 0,53 <sup>b</sup>	0,86 ± 0,03	12,98 ± 0,77	12,70 ± 0,76
2	61,00 ± 0,50 <sup>a,b</sup>	0,84 ± 0,01	12,14 ± 0,94	11,88 ± 0,92
3	61,83 ± 0,58 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,06	12,88 ± 0,99	12,60 ± 0,96
4	62,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,02	18,22 ± 0,75	17,86 ± 0,75
<b>R2</b>	p ≤ 0,05	p ≥ 0,05	p ≥ 0,05	p ≥ 0,05
<b>Efecto</b>	<b>Promedio = 61,2750 Sigma = 1,56038</b>			
	<b>P- valor</b>	<b>P- valor</b>	<b>P- valor</b>	<b>P- valor</b>
<b>{1} Tipo de extracción</b>	0,0021	0,0826	0,0725	0,07238
<b>{2} Temperatura de secado (°C)</b>	0,0603	0,6259	0,5684	0,5695
<b>{3} Tipo de geometría</b>	0,2617	0,9522	0,9941	0,9947

Temperatura de gelatinización (TG), solubilidad de agua (SA), poder de hinchamiento (PH) e índice de agua (IAA)

En la figura 6 se observa que el tipo de extracción por vía húmeda es mayor que por vía seca, similar al análisis de varianza, también se aplicó la prueba Tukey (Tabla 7), que confirma que el mejor tratamiento es el 4, ya que obtuvo el valor más alto de temperatura de gelatinización; independientemente de las otras variables de respuesta.



**Figura 6.** Gráfica de efecto principal para la temperatura de gelatinización

#### 4.1.2. Caracterización de las propiedades del almidón

##### 4.1.2.1 Propiedades fisicoquímicas

En la tabla 8 se encuentran los valores obtenidos de las propiedades fisicoquímicas de almidón de mandioca. El contenido de humedad fue de 4,62 %. Según Arévalo *et al.*, (2018), Novelo y Betancur (2005) reportaron valores mayores tales como 11,81 y 12,72 % respectivamente. Los resultados pueden ser influenciados desde el manejo de las postcosecha previo al almacenamiento, también influye el período de cosecha y su variedad. Según Trujillo

(2014) corrobora que, el rango estándar de la humedad es de 10 a 13 % , si resulta menor a 10 % es mejor para evitar el deterioro del almidón durante su almacenamiento y si es mayor a 13 % se expone al crecimiento de hongos y levaduras.

El contenido de proteína fue de 1,91 % en base seca a comparación de Trujillo (2014) presentó 1,2% de proteína en su almidón; dicha investigación realizó su extracción por vía húmeda con agua destilada, su valor obtenido con este trabajo es similar a lo reportado, mientras que Arévalo *et al.*, (2018) y Novelo *et al.*, (2005) que obtuvieron valores inferiores de 0,5 y 0,16 %, respectivamente, debido a que trabajaron con bisulfito de sodio y cloro, estos reactivos producen una degradación de las moléculas de las proteínas.

La cantidad de grasa expresada fue de 1,15 % en base seca, este resultado fue similar con Trujillo (2014) que reporta 1,22 % de grasa en base seca. Según Vargas y Hernández (2012) obtuvieron un porcentaje menor de 0,62 % de grasa de almidón de mandioca, debido a la variedad de yuca y tipo de extracción.

El contenido de cenizas expresado en base seca fue de 0,13 %, este resultado es menor según los siguientes autores Novelo y Betancur (2005) y Arévalo *et al.*, (2018) que obtuvieron 0,34 y 0,20 % respectivamente de ceniza en base seca. Las cenizas están compuestas por algunas minerales tales como hierro, magnesio, potasio, sodio y calcio, a mayor contenido de cenizas hay más probabilidades que estos minerales están presentes (Repo-Carrasco, Espinoza y Jacobsen, 2003).

Se encontró 0,57 % de fibra en base seca en el almidón de mandioca, mientras que Trujillo (2014) reportó un valor inferior de 0,008 % de fibra. Ambos valores obtenidos de fibra son muy bajos, en comparación con Hernández *et al.*, (2008) que reportó 1,01 % de fibra. Existen diferentes factores que afectan el contenido de fibra tales como la fuente de obtención y el estado de madurez (a mayor madurez mayor contenido de fibra) (Jiménez y Martínez, 2016).

El contenido de carbohidratos es el principal componente de los almidones, el valor obtenido en este estudio fue de 92,18 % en base seca, este resultado fue relativamente mayor según Vargas y Hernández (2012) que obtuvieron 86,9 % de carbohidrato, esto indica que el contenido energético presente en el almidón de yuca es alto.

**Tabla 8.** Composición fisicoquímica del almidón nativo de mandioca

<b>Componentes</b>	<b>Valores (g/100g b.s)</b>		
<b>Humedad (g/100g)</b>	4,62	±	0,1036
<b>Proteína</b>	1,91	±	0,4605
<b>Grasa</b>	1,15	±	0,0011
<b>Ceniza</b>	0,13	±	0,0289
<b>Fibra</b>	0,57	±	0,3262
<b>Carbohidrato</b>	92,18	±	0,2124

En la siguiente tabla 9 se muestra el contenido de amilosa y amilopectina del almidón de mandioca 22,13 y 69,48 %, respectivamente. Hernández *et al.*, (2008) reportaron que el contenido de amilosa en almidones de diferentes variedades de mandioca fue de 15,9 a 22,4 %. Defloor, Dehing y Delcour (1998) cuantificaron los contenidos de amilosa de diferentes genotipos de almidón de mandioca, los resultados del contenido promedio de amilosa varió entre 17,9 a 23,6 %, tanto en la estación seca como en la húmeda. Oladunmoye *et al.*, (2014) reportaron que el contenido de amilosa fue 19,49 % en tubérculos fresco. Guizar (2009) reportó que los almidones ricos en amilosa presentan buenas propiedades mecánicas (tensión, deformación, rigidez y elasticidad) y son menos solubles. Estas diferencias de valores obtenidos en amilosa y amilopectina podrían estar relacionadas con las variedades, condiciones de crecimiento y método de cuantificación (Mali *et al.*, 2002).



**Tabla 9.** Contenido de amilosa y amilopectina del almidón de mandioca

Cuantificación			
<b>Amilosa (%)</b>	22,13	±	0,98
<b>Amilopectina (%)</b>	69,48	±	0,98

#### 4.1.2.2. *Propiedades tecnofuncionales*

La tabla 10 presenta las propiedades tecnofuncionales del mejor tratamiento. El almidón de mandioca presentó una TG de 62,83 °C similar a otras fuentes de almidón, en un rango de 49 a 64 °C y de 62 a 73 °C (Moorthy, 2004) y 62 °C reportado por Karam *et al.*, (2006); la variación de la temperatura depende de la cantidad de agua, pH, grasa y proteína presente en el almidón (Peña, 2017).

**Tabla 10.** Propiedades funcionales de almidón de mandioca

<b>T° G (°C)</b>	<b>% (ISA)</b>	<b>% (PH)</b>	<b>IAA (g gel/g)</b>
62,83 ± 0,29	0,87 ± 0,01	11,68 ± 0,25	12,43 ± 0,24

A medida que se gelatiniza los gránulos de almidón se hinchan por la acción del calor, a una temperatura crítica formando un gel o pasta, los gránulos pequeños generalmente gelatinizan más lentamente y a temperaturas más altas que los gránulos más grandes, relativamente no se cumplió en este presente estudio ya que presentó una TG de 62,83 °C a pesar de tener gránulo pequeños (4,94 – 14,84 um), esto se debe a la variedad de mandioca y al estado de madurez del tubérculo (Novelo y Betancur, 2005).

La solubilidad del almidón ilustran las interacciones de las cadenas poliméricas que comprenden las fracciones de gránulos amorfos y cristalinos (Arévalo *et al.*, 2018). La solubilidad de agua obtenido en el presente trabajo fue 0,87 %, García, Pinzón y Sánchez (2012) reportaron valores de 2 - 3,3 % de solubilidad y según Araujo de Vizcarrondo (2004) indica que los valores deben variar entre 0,27–12,32 %, esto demuestra que existe una buena asociación entre los polímeros del almidón de mandioca (amilosa y amilopectina). Al presentar una alta

solubilidad indica que la estructura interna del almidón se encuentra débil (Novelo y Betancur, 2005).

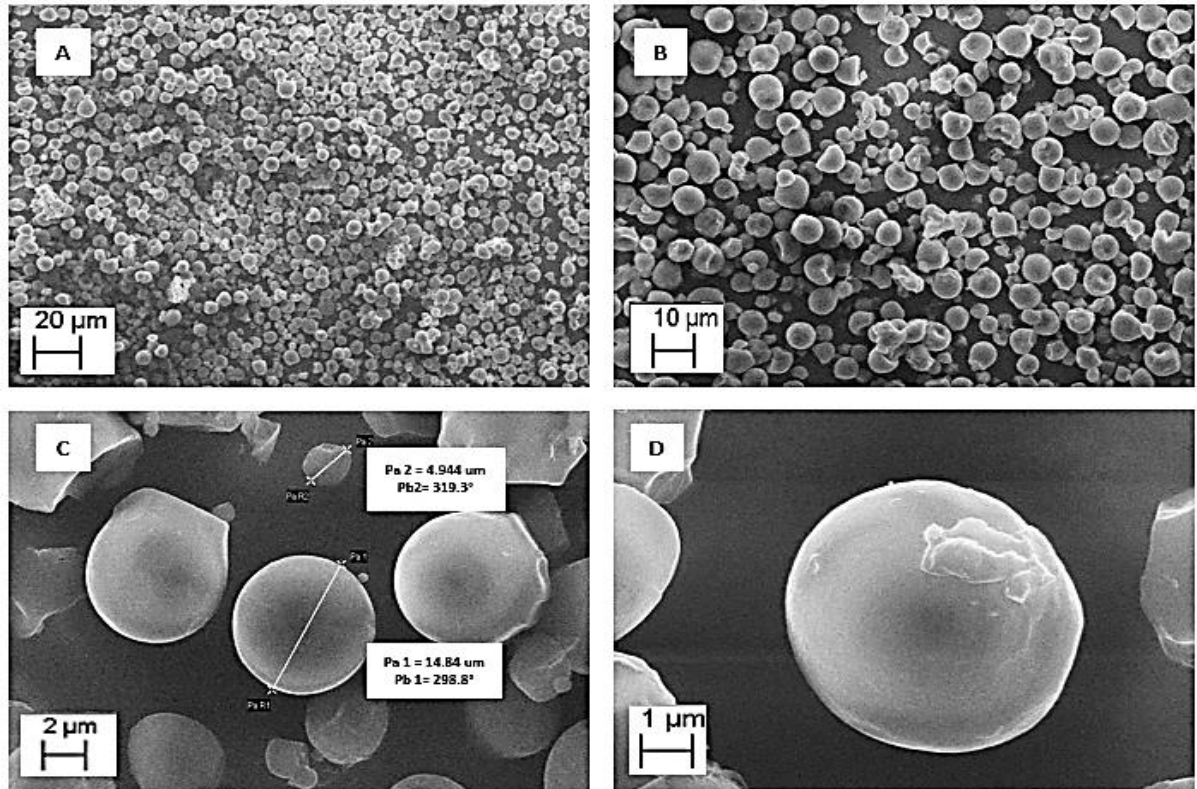
El poder de hinchamiento es uno de los parámetros importantes especialmente en la caracterización de almidones, muestran el hinchamiento de los gránulos a una temperatura determinada (Charles *et al.*, 2007), en un rango bajo afecta la calidad del uso de almidón de mandioca en la industria alimentaria (Moorthy, 2002); la muestra analizada en este trabajo de investigación presentó un alto poder de hinchamiento de 11,68 % a 60 °C, lo que puede atribuirse a la ruptura de los gránulos de almidón a temperatura alta y la consecuente liberación de toda la amilosa de la red de amilopectina; trabajos realizados por Charles *et al.*, (2007), Nuwamanya *et al.*, (2009) mencionan que a altas temperaturas (70 y 80 °C) el valor de poder de hinchamiento incrementa en 2 veces más los valores obtenidos a 30 °C, rangos de 7,87 - 10,77 % a 60 °C y 16,16 - 20,79 % a 80 °C.

El índice de absorción de agua fue de 12,43 g gel/g almidón. Según García *et al.*, (2012) y Aristizábal *et al.*, (2007) reportaron valores entre 0,82–15,52 y 10,7–11,1 g gel / g almidón de mandioca respectivamente, ya que al suministrar calor a la suspensión acuosa del almidón, los gránulos se hinchan aumentando su tamaño, esto indica que un mayor contenido de absorción de agua será un almidón de calidad.

Las propiedades funcionales del almidón de mandioca dependen de la relación de amilosa/amilopectina como también de los factores genéticos (diferentes variedades de mandioca), por el tiempo y época de cosecha entre otras (Jiménez y Martínez, 2016), es por eso la diversidad de resultados comparados con otros investigadores.

#### 4.1.2.3. Propiedades morfológicas

Mediante análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se identificó la forma y tamaño del almidón de mandioca, como se muestra en la figura 7.



**Figura 7.** Micrografías del grano de almidón de mandioca obtenidas por MEB. A)X500, B) X1000, C)X5000 D)X10000

Las micrografías presentan formas esféricas y ovoides, se observaron diferentes morfologías superficiales en los diferentes gránulos, que iban desde unos pocos gránulos de superficie rugosa hasta unos gránulos de superficie predominantemente lisos. Algunos gránulos tenían poros superficiales o fisuras, otros presentaron terminales truncadas como si hubiesen recibido cortes en direcciones aleatorias en solo uno de sus extremos, este resultado coincide con la morfología reportada por los autores Medina y Salas (2007), Jiménez y Martínez (2016).

La morfología de los gránulos dependen de la estructura de la amilopectina, en este trabajo de investigación presentan granos esféricos y pequeños esto significa que tienen mayor número de amilopectina con ramificaciones de cadenas cortas. Sin embargo Casarrubias *et al.*,

(2012), encontraron gránulos alargados de almidón de mandioca esto se debe a la presencia de amilopectina con pocas ramificaciones alargadas.

El tamaño de los gránulos en las líneas parentales osciló entre 4,94 a 14,84  $\mu\text{m}$ . Moorthy (2002) y Nuwamanya *et al.*, (2009) reportaron tamaños de gránulos de almidón de mandioca de 3 - 43  $\mu\text{m}$  y 8, 14 - 10,77  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Según lo reportado por Medina y Salas (2007) los promedios reportados fueron 15  $\mu\text{m}$  para la yuca, 12,2  $\mu\text{m}$  para el maíz y 34, 55  $\mu\text{m}$  para la papa.

#### ***4.1.2.4. Propiedades térmicas***

En la figura 8 se muestra el termograma DSC de almidón de mandioca donde se representa la transmisión térmica de gelatinización.

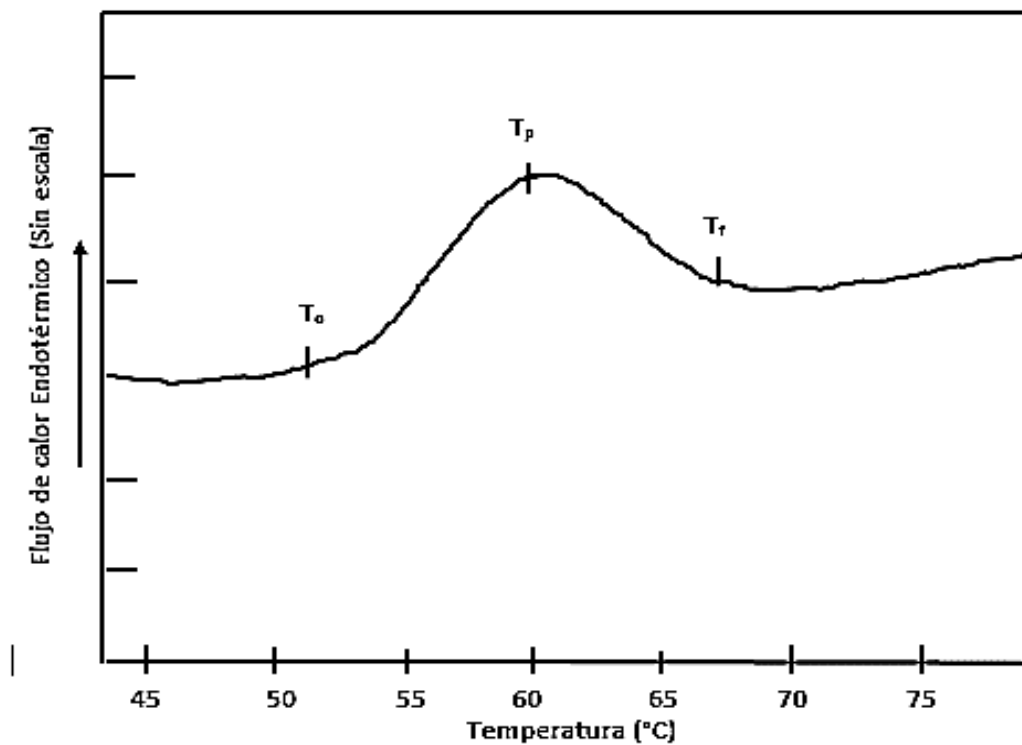
El proceso empieza a 52,98  $^{\circ}\text{C}$  que representa la temperatura inicial ( $T_o$ ), donde el almidón empieza a perder su ordenamiento molecular, los puentes de hidrógenos de la zona amorfa se rompen y permite que el agua se asocie con los grupos hidroxilos. La temperatura pico ( $T_p$ ), fue de 59,8  $^{\circ}\text{C}$  donde se registran los valores más altas de absorción de calor de almidón en el cual los gránulos de almidón están completamente hidratados. La temperatura final ( $T_f$ ) fue de 67,64  $^{\circ}\text{C}$  cuyo valor se representa a medida que el proceso llega a su fin, es cuando el gránulo de almidón está completamente desintegrado (Tabla 11).

Según Charles *et al.*, (2005) en 5 variedades de yuca analizadas presentó un rango de  $T_o$  de 59,7 a 64,4  $^{\circ}\text{C}$ , en  $T_p$  fue de 64,4 a 69,9  $^{\circ}\text{C}$  y en  $T_f$  fue de 71,6 a 75,7  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Mientras que Novelo y Betancur (2005) presentaron las siguientes temperaturas;  $T_o$  de 57,6  $^{\circ}\text{C}$ ,  $T_p$  fue de 65,2  $^{\circ}\text{C}$  y  $T_f$  fue de 75,4  $^{\circ}\text{C}$ . La diferencia de temperatura se debe a la morfología de grano y sus concentraciones de amilosa y amilopectina.

**Tabla 11.** Temperatura y entalpía de gelatinización de almidón de mandioca

$T_o$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H$ (J/g, b.s)
52,98 ± 0,03	59,8 ± 0,07	67,64 ± 0,2	10,52 ± 0,11

La diferencial de entalpía de gelatinización ( $\Delta H$ ) indica la pérdida de orden molecular (región cristalina) que ocurre en el gránulo de almidón durante su gelatinización. El valor obtenido en la  $\Delta H$  del almidón de mandioca fue de 10,52 J/g. Este resultado es relativamente mayor a los reportados de Novelo y Betancur (2005) y menor según lo reportado por Charles *et al.*, (2005); quienes reportaron 9,60 y 12,8 a 13,7 J/g respectivamente. La diferencia hallada es por el contenido de amilosa y amilopectina, los valores bajos  $\Delta H$  están relacionados con los niveles más altos de amilosa.

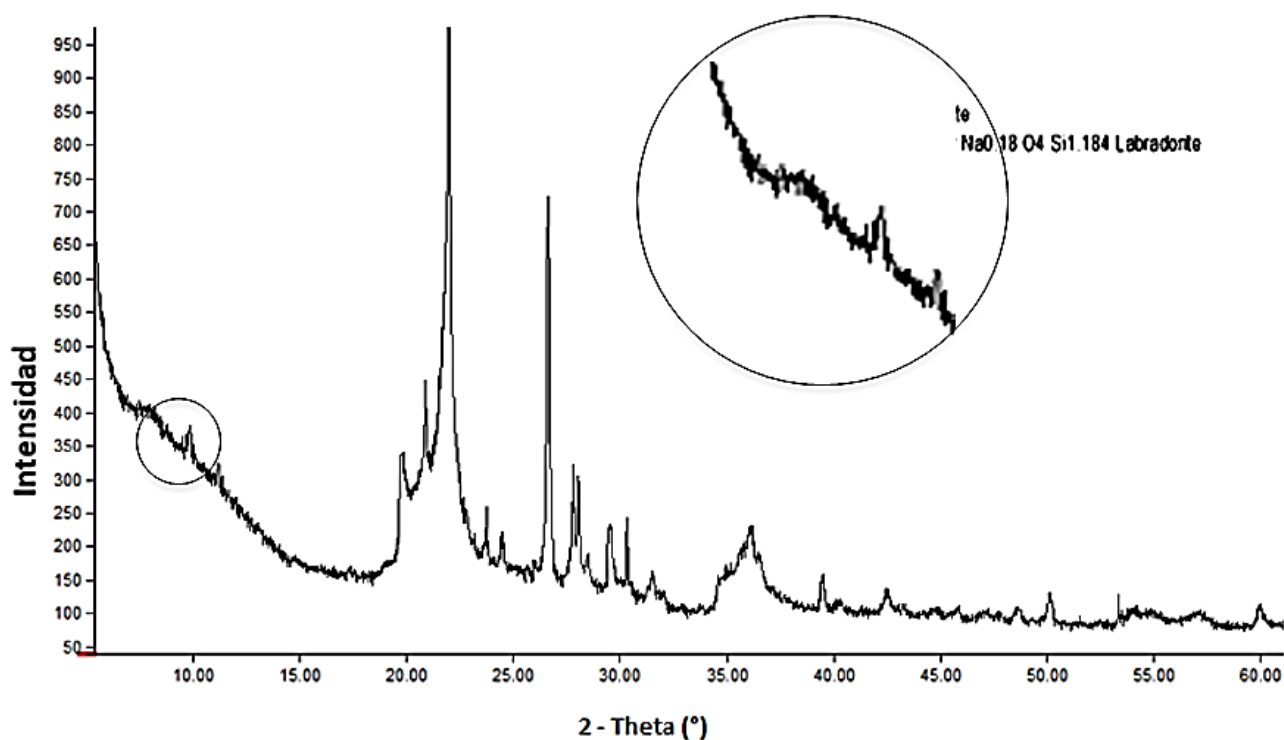


**Figura 8.** Termograma por DSC de almidón de mandioca.

## 4.2 Organoarcilla

### 4.2.1 Obtención y caracterización de la organoarcilla.

La organoarcilla fue caracterizada a través de su difractograma, que se presentan en la figura 9, las distancias interplanares de los picos característicos de las arcillas (principales y secundarias).



**Figura 9.** DRX de la organoarcilla (OA)

El perfil de difracción obtenido fue tratado con la ley de Bragg, el pico a determinar fue encontrado en el rango de 7 y 8 °.

$$2d \operatorname{sen} \theta_g = n \lambda$$

$$d = \frac{0,9 \times 1,716}{2 \operatorname{sen} \left( \frac{7,52}{2} \right)}$$

$$d = 11,77 \text{ \AA} \approx 1,117 \text{ nm}$$

La figura 9 muestra un pico característico en  $2\theta = 7,52^\circ$  ( $d_{001} = 11,768 \text{ \AA}$  o  $1,17 \text{ nm}$ ), que corresponde al plano (001) de la organoarcilla (organofílicos), el pico de caracterización de la organoarcilla se desplazó a ángulos inferiores. El aumento es espaciado entre capas

interlaminares de las galerías de silicato de 18,5 Å a 44,14 Å confirma la penetración de las cadenas, en las capas de silicato y el desarrollo de una estructura intercalada. Además, la reducción en la intensidad del pico de caracterización de la arcilla orgánica, sugiere la formación de una estructura parcialmente exfoliada de plaquetas orgánicas.

Los MMT Corral Na<sup>+</sup> presentó un pico principal alrededor de  $2\theta = 6,5^\circ$ ,  $d_{001} = 13,6$  Å. Los picos secundarios presentados por esta arcilla son característicos de los argilominerales, en la mayoría de los casos, la arcilla Corral Na<sup>+</sup> puede estar constituida por una mezcla de argilominerales (Albers, Melchades, Machado, Baldo, y Boschi, 2002).

Para examinar los cambios en la composición de la montmorillonita organofílica (OMMT) con tratamiento térmico; (Lee, Lim, y Ok Park, 2000) realizaron análisis elemental de peso de la OMMT antes y después del tratamiento térmico en condiciones de temperatura ambiente, la muestra fue extraída con dimetil di (sebo hidrogenado) cloruro de amonio M20A y M30B, las cuales con el transcurso del tiempo muestran la disminución de todos los elementos constituyentes, lo que indica que la descomposición térmica ocurrió. Notablemente, estas disminuciones fueron aproximadamente proporcionales a la cantidad inicial de cada elemento. Esta descomposición, confirma claramente que las desorciones térmicas de los iones orgánicos, que pueden ser los iones parcialmente descompuestos o completos, se producen con el tratamiento térmico, lo que resulta en la disminución del espaciado entre capas.

En estudios anteriores sobre complejos orgánicos/inorgánicos intercalados con iones orgánicos, se informó que la disminución del espaciado entre capas con el aumento de la temperatura se debía a la liberación de moléculas orgánicas por descomposición térmica de este complejo: desorción térmica del ion orgánico y la descomposición térmica de la propia molécula orgánica (Ahmed y Dutta, 2002; Suárez *et al.*, 1998).

## **4.3 Biopelículas**

### **4.3.1. Caracterización de la biopelícula activa.**

Los parámetros seleccionados en la tabla 5 y 6, posibilitaron la obtención de biopelículas a base de almidón de mandioca, glicerol, goma arábica, aceite esencial y organoarcilla. Las biopelículas se muestran en el anexo 3.

#### ***4.3.1.1. Propiedades mecánicas***

##### **a. Fuerza de ruptura (MPa)**

El modelo estadístico fue obtenido a través de la codificación y normalización de los niveles establecidos (en los valores -1, 0, +1), que relaciona la variable respuesta con las variables independientes (contenido de organoarcilla (OA), aceite esencial de romero (AR) y almidón de mandioca (AM)).

En la tabla 12 las biopelículas presentaron valores de fuerza a la ruptura de 1,4 a 5,11 MPa. La biopelícula que presentó el menor valor de fuerza de ruptura (1,4 MPa) fue el tratamiento 2 que solo tenía 0,2 g/100g de organoarcilla y el tratamiento 4 con 0,4 g/100g de organoarcilla presentó 5,11 MPa. Los resultados del % de elongación fueron de 29,4 a 77,7 %; los tratamientos 2 y 3 presentaron los mejores resultados compuestos por 0,2 g/100g de organoarcilla.



**Tabla 12.** Propiedades mecánicas de las biopelículas

T	Espesor (mm)	Propiedades mecánicas	
		Fuerza de ruptura N/m <sup>2</sup> (MPa)	% Elongación
1	0,17 ± 0,01	1,6 ± 0,0	74,1 ± 0,8
2	0,25 ± 0,01	1,4 ± 0,7	77,7 ± 0,6
3	0,21 ± 0,00	2,4 ± 0,5	76,4 ± 0,5
4	0,18 ± 0,01	5,1 ± 0,4	38,1 ± 0,3
5	0,19 ± 0,01	1,5 ± 0,2	72,5 ± 0,7
6	0,46 ± 0,04	1,5 ± 0,4	29,4 ± 0,1
7	0,26 ± 0,01	1,6 ± 0,0	61,2 ± 0,5
8	0,25 ± 0,02	1,5 ± 0,1	75,4 ± 0,6
9	0,22 ± 0,01	1,9 ± 0,1	31,8 ± 0,3

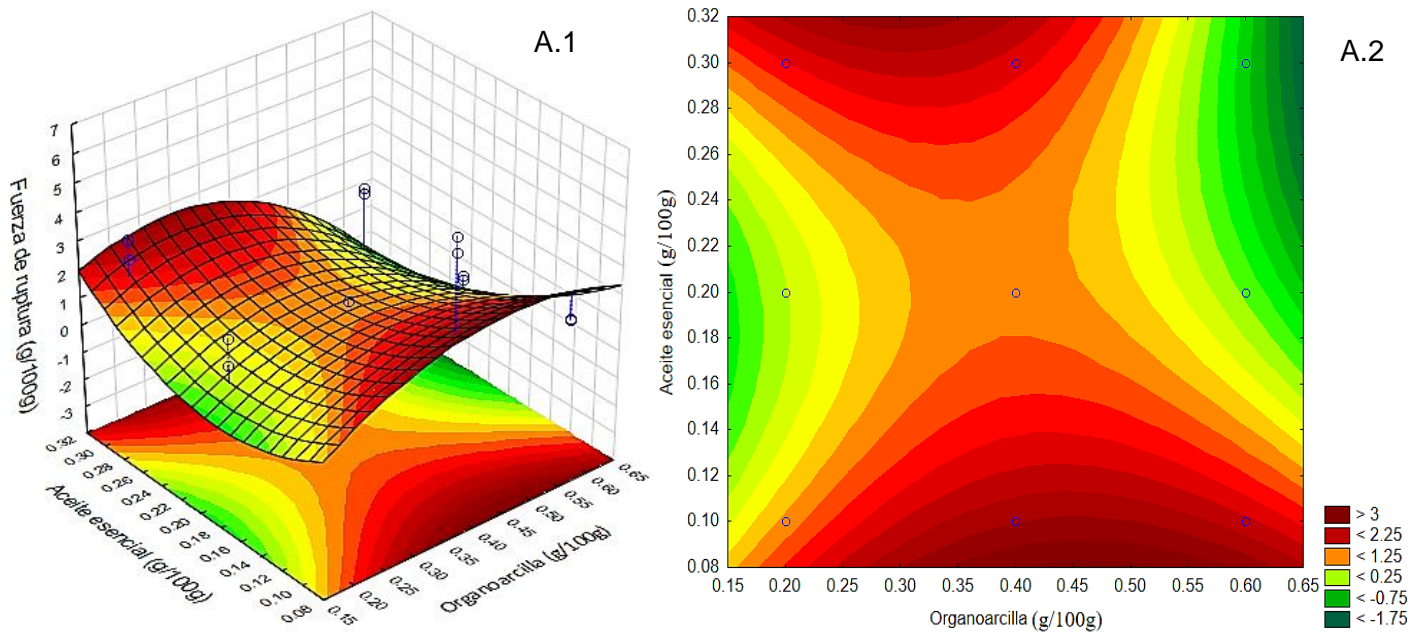
En la tabla 13 se presenta el análisis de varianza para los factores (organoarcilla, aceite esencial, almidón) y las interacciones, donde se observó que todas los factores son significativas e incluyendo la interacción cuadrática, al nivel de confianza de 95 % ( $p \leq 0,05$ ). Los factores cuadráticos, son considerados en un delineamiento de planificación experimental con la finalidad de incrementar la curvatura de una superficie, para ubicar los puntos de máximo y mínimo. Este modelo presentó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 72 % de la variabilidad de los resultados que son explicados con los factores estudiados.

**Tabla 13.** Análisis de varianza de fuerza de ruptura (MPa)

Factor	R:0,7227			R-Adj:0,5286	
	SC	GL	CM	F-valor	P-valor
<b>(1) Organoarcilla (g/100g)(L)</b>	1,000	1	0,952	7,853	0,00021
<b>Organoarcilla (g/100g)(Q)</b>	4,884	1	4,884	40,287	0,00013
<b>(2) Aceite esencial (g/100g)(L)</b>	2,394	1	2,394	19,748	0,00161
<b>Aceite esencial (g/100g)(Q)</b>	3,920	1	3,920	32,338	0,00030
<b>(3) Almidón (g/100g)(L)</b>	15,618	1	15,618	128,826	0,00000
<b>Almidón (g/100g)(Q)</b>	1,702	1	1,702	14,039	0,00458
<b>1 Q por 2 Q</b>	2,993	1	2,993	24,687	0,00077
<b>Falta de ajuste</b>	10,716	1	10,716	88,394	0,00001
<b>Puro error</b>	1,091	9	0,12123		
<b>Total SS</b>	42,582	17,000			

Donde: SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, los términos en rojo son significativos bajo un  $p \leq 0,05$

La interacción de la organoarcilla y aceite de esencial influye sobre la fuerza de ruptura, ya que el aceite disminuye el poder que tiene la organoarcilla para mejorar esta propiedad mecánica en la estructura de la biopelícula (Chivrac, Pollet, Dole, y Avérous, 2010). En la figura 10, se observó que la mayor fuerza de ruptura se da en concentraciones menores de aceite de romero 0,10 g/100 g y concentraciones mayores de organoarcilla de 0,40 a 0,6 g/100 g.



**Figura 10.** Gráficas de superficie de respuesta y contorno de fuerza de ruptura (MPa).

Los coeficientes de regresión para el modelo polinomial y la gráfica de Pareto se encuentran en el anexo 5 y 6 respectivamente. La ecuación ajustada para el modelo matemático es representada en la ecuación 17, donde la interacción cuadrática entre la organoarcilla y el aceite de romero presentaron un efecto negativo reduciendo en 132,398 MPa la fuerza de ruptura de las biopelículas.

Ecuación de la figura 10 (A<sub>1-2</sub>) :

$$\text{Fuerza de ruptura} = 21,129 + 20,692 \text{ OA} - 21,446 \text{ OA}^2 - 44,067 \text{ AR} + 123,714 \text{ AR}^2 - 7,984 \text{ AM} + 0,772 \text{ AM}^2 - 132,398 \text{ OA}^2\text{AR}^2 \dots \text{ (Ec. 17)}$$

Donde:

OA: Organoarcilla (g/100g)

AR: Aceite esencial de romero (g/100g)

AM: Almidón de mandioca (g/100g)

El análisis de varianza para la variable respuesta de elongación % se muestra en la tabla 14, este modelo presentó un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 95 % de la variabilidad de los resultados que son explicados con los factores mencionados.

La organoarcilla y el aceite esencial son factores significantes ya sea lineal o cuadrática, estas influyen en el % de elongación ( $p \leq 0,05$ ) al igual que el almidón cuadrático.

**Tabla 14.** Análisis de varianza de elongación (%)

FACTOR	R:0,9563 R-Adj:0,9258				
	SC	GL	CM	F-valor	P-valor
(1) Organoarcilla (g/100g)(L)	684,785	1	684,785	33,791	0,00026
Organoarcilla (g/100g)(Q)	1049,22	1	1049,22	51,774	0,00005
(2) Aceite esencial (g/100g)(L)	595,841	1	597,841	29,501	0,00042
Aceite esencial (g/100g)(Q)	1820,16	1	1820,16	89,817	0,00001
(3) Almidón (g/100g)(L)	31,493	1	31,493	1,554	0,24401
Almidón (g/100g)(Q)	4327,447	1	4327,447	214	0,00000
Falta de ajuste	222,814	2	111,407	5,497	0,02754
Puro error	182,387	9	20,267		
Total SS	8916,147	17			

Donde: SC: Suma de cuadrados ,GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, los términos en rojo son significativos bajo un  $p \leq 0,05$

Los coeficientes de regresión para el modelo polinomial y la gráfica de Pareto se encuentran en el anexo 7 y 8 respectivamente. La ecuación ajustada para el modelo matemático es presentada en la ecuación 18, donde los coeficientes significativos corresponden a los valores cuadráticos y lineales de la organoarcilla y aceite esencial de romero.

$$\%E = -1084,321 - 361,688 OA + 404,896 OA^2 - 782,683 AR - 2133,167 AR^2 + 393,080 AM - 32,892 AM^2 \dots \dots \dots (Ec. 18)$$

Donde:

OA: Organoarcilla (g/100g)

AR: Aceite esencial de romero (g/100g)

AM: Almidón de mandioca (g/100g)

Rocha *et al.*, (2014) mencionaron que uno de los factores que más afectan a las propiedades mecánicas y/o físicas de las películas hidrofílicas es el contenido del plastificante ya que el glicerol ejerce mayor influencia, esto significa que cuanto mayor sea el contenido de glicerol en la biopelículas, tendrán mayor flexibilidad y menor resistencia de tracción; en el presente trabajo de investigación se estandarizó el contenido del plastificante, con la finalidad de ver la interacción de la organoarcilla en la fuerza de ruptura (MPa) y elongación (%) de las biopelículas.

El porcentaje de elongación se incrementa cuando el contenido de organoarcilla es mayor y al ser agregado al material, parte de esta rigidez que posee es transferido a la matriz del almidón, lo cual coincide a lo reportado por muchas investigaciones, las propiedades mecánicas mejoran con el aumento de MMT-OM, ya que contribuye a una mejor compatibilidad con la matriz polimérica (Chen y Evans, 2005).

La montmorillonita orgánicamente modificada (MMT-OM) tiene una estructura hidrofílica, de buena afinidad con las cadenas de almidones y un alto grado de agregación en una matriz de almidón plastificado. El uso del plastificante como un compatibilizador órgano-modificado ayuda a la interacción entre las moléculas de arcilla y almidón, de esta forma actúan como refuerzo en las propiedades mecánicas de las películas (Carvalho, Avérous y Tadini, 2011).

La adición de aceite esencial de romero en la matriz de la biopelícula influyó en la fuerza de ruptura (MPa) y elongación (%) a 0,2 g/100g, los rangos más bajos que oscilan de 1,4 a 1,5 MPa y valores altos de 72,5 a 77,6 % respectivamente. Šuput *et al.*, (2016) reportó que la adición de aceites esenciales (Comino negro [0,5 - 1 y 2 %] y orégano [0,5 - 1 y 2%]) ambos disminuyeron la fuerza de ruptura (MPa) de 10,02 a 2,3 MPa y 10,65 a 2,12 MPa respectivamente, esto indica la pérdida de movilidad macromolecular; mientras que la elongación (%) se incrementó de 38 a 52% y 32 a 61% respectivamente. A mayor concentración de aceite los valores de fuerza de ruptura (MPa) disminuyen y los valores de elongación (%)

aumentan, estos resultados son comunes en la incorporación de aceites esencial en matrices de biopolímeros.

Pelissari, Grossmann, Yamashita, y Pineda (2009), observaron una disminución en la fuerza de ruptura y un aumento en la elongación en películas a base de almidón de mandioca y aceite esencial de orégano, las concentraciones de aceite fueron de 0,1, 0,5 y 1%, donde observó un aumento en de alargamiento a la ruptura de 27,18, 40,73 %, y alcanzando un máximo de 48,4 % para 1 % de aceite esencial de orégano, lo que ratifica la relación de los resultados obtenidos.

#### ***4.3.1.2. Permeabilidad de vapor de agua (PVA)***

En la tabla 15 se aprecian los resultados de la PVA de las biopelículas los cuales están entre  $1,01 - 2,89 \times 10^{-5}$  g/hMPa. Los tratamientos que presentaron menor PVA fueron 9,7 y 5 de 1,2;  $1,5$  y  $1,6 \times 10^{-5}$  g/hMPa respectivamente, los que obtuvieron valores promedios fueron los tratamientos 2, 8 y 1 de  $1,9$ ;  $2,2$  y  $2,9 \times 10^{-5}$  g/hMPa respectivamente y por último los valores mayores en PVA fueron los tratamientos 6, 4 y 3 de  $3,5$ ;  $4,6$  y  $5,2 \times 10^{-5}$  g/hMPa respectivamente.

Los 9 tratamientos alcanzaron 0,16 a 0,49 mm de espesor, según Vicentini (2003) reportó  $9,5 \times 10^{-9}$  a  $3,83 \times 10^{-8}$  g/hMPa de PVA con espesor que varía de 0,017 a 0,090 mm . La PVA, puede variar con el espesor de las biopelículas debido a los cambios estructurales causados por el hinchazón de la matriz hidrofóbica, afectando la estructura de las biopelículas y provocando tensiones internas que pueden influir en la permeabilidad; es por ello que a menor espesor de la película menor será su permeabilidad de vapor de agua.

En la tabla 16, se presenta el análisis de varianza para la permeabilidad de vapor de agua, donde se observó que el único factor significativo es el almidón ya sea lineal o cuadrático. Este modelo presentó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 58 % de variabilidad de los resultados que son

**Tabla 15.** Permeabilidad de vapor de agua y % solubilidad

<b>T</b>	<b>Permeabilidad de vapor de agua <math>10^{-5}</math> (g/h MPa)</b>	<b>% Solubilidad</b>
<b>1</b>	2,9 $\pm$ 0,4	54,0 $\pm$ 0,0
<b>2</b>	1,9 $\pm$ 0,8	58,9 $\pm$ 0,1
<b>3</b>	5,2 $\pm$ 0,5	37,3 $\pm$ 0,2
<b>4</b>	4,6 $\pm$ 0,7	64,1 $\pm$ 0,3
<b>5</b>	1,6 $\pm$ 0,4	48,8 $\pm$ 0,0
<b>6</b>	3,5 $\pm$ 0,8	75,1 $\pm$ 0,2
<b>7</b>	1,5 $\pm$ 0,3	57,8 $\pm$ 0,2
<b>8</b>	2,2 $\pm$ 0,2	47,6 $\pm$ 0,4
<b>9</b>	1,2 $\pm$ 0,3	56,2 $\pm$ 0,2

explicados con los factores mencionados. El coeficiente  $R^2$  es la relación de la variación explicada a la variación total, un valor  $R^2$  superior a 0.8 muestra un mejor ajuste al modelo de regresión de la variable respuesta (Sin *et al.*, 2006).

Los coeficientes de regresión para el modelo polinomial y gráfica de Pareto se encuentran en el anexo 9 y 10 respectivamente. La ecuación ajustada para el modelo matemático es presentada en la ecuación 19:





los mismos autores añadieron 1 % de ácido cítrico (agente compatible), en sustitución del glicerol y obtuvieron valor de  $3,6 \times 10^{-6}$  g/hMPa para PVA, inferior a los obtenidos en el presente estudio para las biopelículas con aceite esencial de romero.

Oliveira (2009), también realizó la prueba de PVA a sus biopelículas con y sin adición de organoarcilla y plastificante (glicerol) con 0,20 y 0,30 g de glicerol/g fécula seca en períodos de agitación de 20, 40 y 60 min, reportando que a mayor contenido de plastificante (glicerol) aumenta la PVA. La concentración de organoarcilla fue de 0,01 g /g fécula seca, los períodos de agitación de la suspensión acuosa de organoarcilla no afectaron significativamente los valores de PVA de las películas, en comparación con los valores encontrados para las películas sin organoarcilla.

Uno de los factores importantes que afecta la PVA es el plastificante (glicerol), su presencia disminuye las fuerzas intermoleculares en las cadenas del polímero, generando mayor movilidad molecular y así aumentando su PVA (Villada y Joaqui, 2013), pero según los datos obtenidos en este trabajo el glicerol fue igual para todos y no hay significancia. Sin embargo el aumento en la concentración de organoarcilla reduce la PVA en aproximadamente un 50% (Oliveira, 2009).

Park *et al.*, (2003) y Chen, Evans (2005) mencionan que la reducción de la PVA en películas compuestas de almidón y organoarcilla al ser comparadas con películas de almidón, asocian este efecto a una reducción del coeficiente de difusión efectivo, debido a la presencia de la organoarcilla.

Šuput *et al.*, (2016) reportaron que la adición de aceites esenciales (Comino negro [0,5 - 1 y 2 %] y orégano [0,5 - 1 y 2%]), disminuyen la PVA, esto se produce a través de la parte hidrofílica de la película, entonces a mayor concentración de aceite se tendrá una mejor propiedad de barrera (PVA). Kechichian *et al.*, (2010) también reporta que la adición de ingredientes antimicrobianos (Canela y clavo en polvo) influye significativamente en la matriz

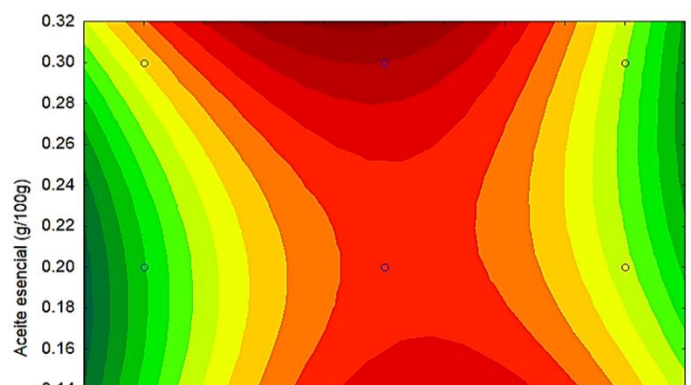
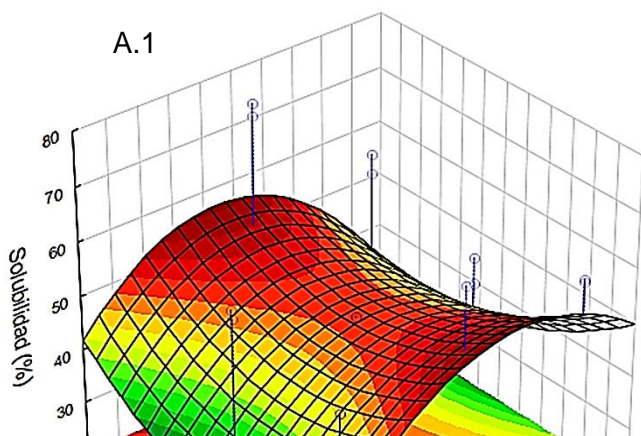
de la película biodegradable de mandioca como barrera de vapor de agua. Los aceites esenciales son mezclas altamente complejas e hidrofóbicas, el aumento de la hidrofobicidad de la película reducirá la absorción de agua, esto también ocurre en la PVA disminuye con un aumento de la fracción del compuesto hidrofóbico. Entonces la PVA depende de la relación hidrofílico-hidrofóbica de los constituyentes de la película (Pelissari *et al.*, 2009).

#### 4.3.1.3. Solubilidad de agua

En la tabla 15, se muestran los resultados de solubilidad de los 9 tratamientos de biopelículas que presentaron valores de 37,3 a 75,1 %. Los tratamientos que presentan menor solubilidad en agua fueron el 3, 8 y 5 de 37,3; 47,6 y 48,8 % respectivamente, los que obtuvieron valores promedio fueron los tratamiento 1, 9 y 7 de 54; 56,2 y 57,8 % respectivamente y por último los valores mayores fueron los tratamiento 2, 4 y 6 de 58,9; 64,1 y 75,1 % respectivamente. Las biopelículas que presentan una alta solubilidad tienen una baja resistencia al agua (Vicentini, 2003).

Para evaluar el impacto de los factores en la solubilidad de agua se realizó un análisis de varianza mostrado en la tabla 17, donde se observa que la interacción cuadrática de la organoarcilla y el aceite esencial de romero son significativas, eso quiere decir que influye en el resultado de la solubilidad. Este modelo presentó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 65 % de la variabilidad de los resultados que son explicados con los factores estudiados.

En la figura 11 [A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>], se observa una tendencia de valores mínimos de solubilidad en agua (37,31%) para contenidos de organoarcilla ( $\leq 0,62$  g/100g), aceite de romero (0,14 - 0,24 g/100g).



A.2

**Tabla 17.** Análisis de varianza del índice de solubilidad de agua

Factor	R: 0,65268 R-adj: 0,40955				
	SC	GL	CM	F-valor	P-valor
(1) Organoarcilla (g/100g)(L)	42,563	1,000	42,563	10,003	0,011499
Organoarcilla (g/100g)(Q)	457,960	1,000	457,960	107,629	0,000003
(2) Aceite esencial (g/100g)(L)	18,253	1,000	18,253	4,290	0,068232
Aceite esencial (g/100g)(Q)	127,690	1,000	127,690	30,009	0,000391
(3) Almidón (g/100g)(L)	2,168	1,000	2,1675	0,5094	0,493490
Almidón (g/100g)(Q)	113,251	1,000	113,2513	26,6160	0,000596
1Q por 2Q	57,760	1,000	57,760	13,575	0,005041
Falta de ajuste	610,613	1,000	610,613	143,505	0,000001
Puro error	38,295	9,000	4,2550		
<b>Total SS</b>	1868,325	17,000			

Donde: SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, los términos en rojo son significativos bajo un  $p \leq 0,05$

Los coeficientes de regresión para el modelo polinomial y gráfica de Pareto se encuentran en el anexo 11 y 12 respectivamente. La ecuación ajustada para el modelo matemático es representada en la ecuación 20, la interacción cuadrática, entre la organoarcilla y el aceite esencial de romero presentaron un efecto negativo reduciendo en 581,633 % la solubilidad de las biopelículas.

Ecuación de la figura 11 (A<sub>1-2</sub>):

$$\%S = 554,981 + 223,417 OA - 240,357 OA^2 - 238,333 AE + 673,571 AE^2 - 178,593 AM + 14,970 AM^2 - 581,633 OA^2AR^2 \dots \dots \dots (Ec. 20)$$

Donde:

OA: Organoarcilla

AR: Aceite esencial de romero

AM: Almidón de mandioca

Resultados similares de biopelículas a base de almidón de mandioca, sorgo y glicerol oscilaron de 30,19 a 57,78 % de solubilidad (Arévalo *et al.*, 2018). Las películas basadas en almidón de mandioca, glicerol y proteína de soya mostraron solubilidad de 14,84 a 60,96 % (Oliveira, 2009). En biopelículas de almidón de mandioca doblemente modificado presentaron valores de solubilidad de 20,43 a 45,71 % según Trujillo (2013).

Los procesos que conducen a la descomposición del almidón y la liberación de amilosa en solución también afectan positivamente la solubilidad del almidón, como el calentamiento y el tratamiento químico, mientras que los tratamientos que refuerzan la estructura cristalina reducen la solubilidad del almidón (Jyothi, Kiran *et al.*, 2007; Lertphanich *et al.*, 2013).

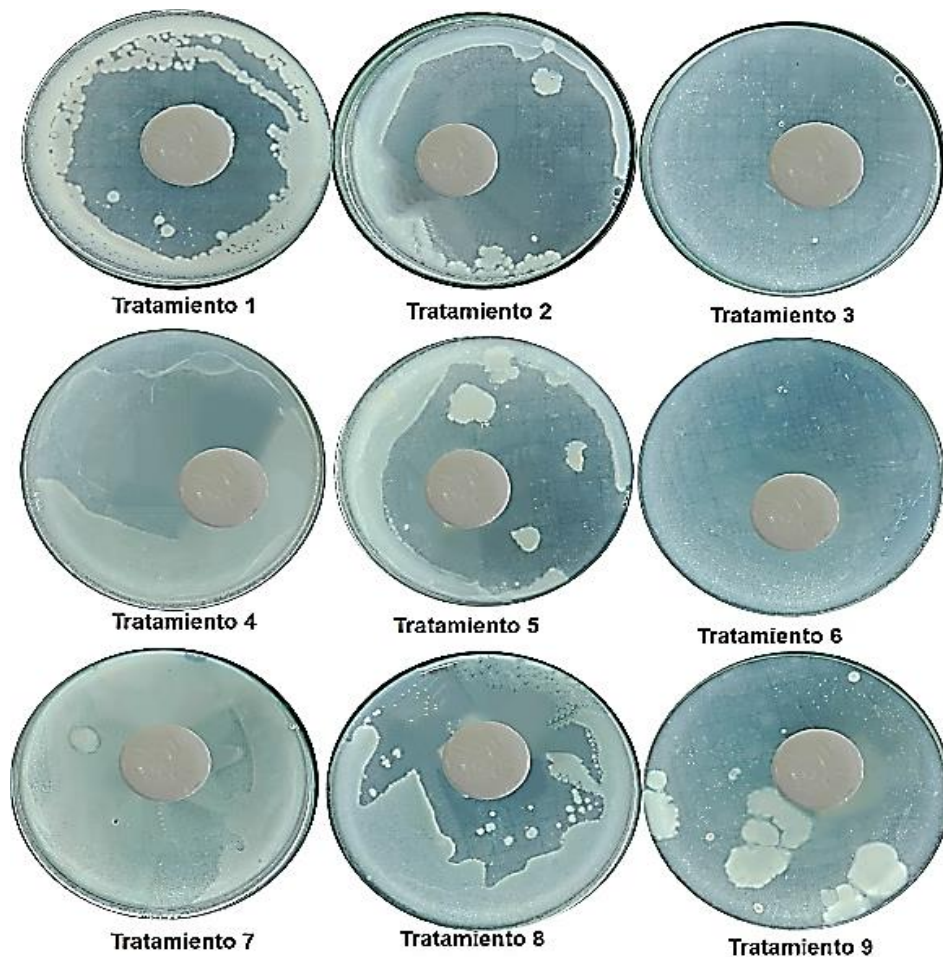
La solubilidad involucra a las moléculas de agua en la matriz polimérica, seguido de una ruptura brusca de las fuerzas de Van der Waals en las cadenas poliméricas. La solubilidad está relacionada con la PVA, mientras mayor sea esta menor será el % solubilidad (Aguilar *et al.*, 2012).

En la película la solubilidad es una característica física importante que determina su biodegradabilidad, cuando se utiliza como un medio para proteger y conservar los alimentos (Frutos y hortalizas). Se requiere tener una baja solubilidad en las biopelículas durante el período de almacenamiento, por otra parte tener una alta solubilidad podría beneficiar a los productos que requieren hidratación antes de su consumo (Anchundia *et al.*, 2016).

#### **4.3.1.4. Actividad antimicrobiana**

Se realizó el estudio antimicrobiano a las biopelículas, para identificar el poder de inhibición del aceite esencial de romero, utilizando el método de difusión en disco, contra las bacterias gram negativas (*Enterobacterias*) y gram positivas (*Staphylococcus Aureus*), microorganismos comunes en la industria alimentaria; el aceite esencial de romero no se difundió en el agar adyacente a la biopelícula, solo se inhibió el crecimiento de los microorganismos que están en contacto con la zona activa, de este modo se pudo determinar la cantidad mínima necesaria de aceite esencial de romero para desarrollar biopelículas con propiedades antimicrobianas.

En la figura 12 se observó halos de inhibición de las 9 biopelículas a diferentes concentraciones de aceite esencial de romero contra los microorganismos de prueba, los halos de inhibición pequeños se observaron para las biopelículas que contenían menos aceite de romero (g/100g), hubo menos inhibición de bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*) y una mayor inhibición de las bacterias gramnegativas (*Enterobacterias*), los datos cuantificados son mostrados en la tabla 18.



**Figura 12.** Inhibición de microorganismos

El aumento de concentración de aceite esencial de romero a 0,3 g/100g originó un 100 % de inhibición de los microorganismos a prueba, como se muestra en la figura 13, el tratamiento 3 y 6 presentaron una alta inhibición al aumento de los microorganismos (NP UFC/g) en 48 h. No obstante la aparición de *staphylococcus* y las *enterobacterias* en la biopelícula (Tratamiento 4) inhibió totalmente el aumento de las enterobacterias, pero si hubo presencia de *S. Aureus* ( $1 \times 10^2 \pm 0,2$  UFC/g); las demás biopelículas con bajo contenido de aceite esencial de romero no inhibieron el crecimiento de los microorganismos en la zona adyacente, las cuales aumentaron significativamente ( $p \leq 0,05$ ), donde la mayor aparición fue  $4 \times 10$  UFC/g de *enterobacterias* y  $4 \times 10^2$  UFC/g de *S. Aureus*.

**Tabla 18.** Actividad antimicrobiana

<b>T</b>	<b>Actividad antimicrobiana</b>					
	<b><i>Enterobacterias</i></b>			<b><i>S. aureus</i> (x</b>		
	<b>(X 10 UFC/g)</b>			<b>10<sup>2</sup> UFC/g)</b>		
<b>1</b>	3	±	0,0	4	±	0,6
<b>2</b>	3	±	1,2	2	±	0,2
<b>3</b>	1	±	0,0	0	±	0,0
<b>4</b>	0	±	0,0	1	±	0,2
<b>5</b>	4	±	0,6	1	±	0,1
<b>6</b>	0	±	0,0	0	±	0,0
<b>7</b>	2	±	1,2	1	±	0,2
<b>8</b>	3	±	1,2	1	±	0,1
<b>9</b>	2	±	0,6	1	±	0,1

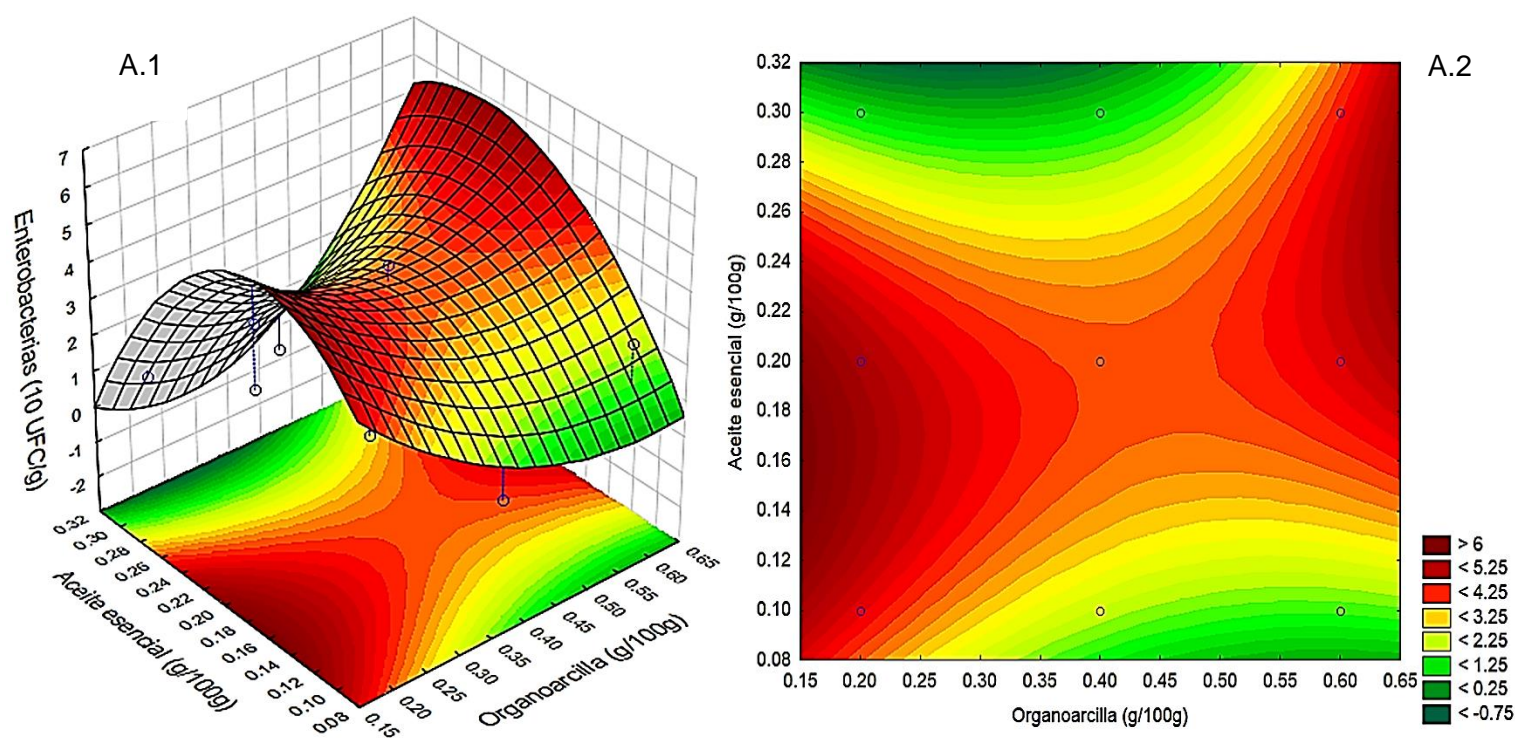
En la tabla 19, se presenta el análisis para actividad antimicrobiana (enterobacterias), donde se observó que la interacción lineal es significativa entre la organoarcilla y el aceite esencial de romero. Este modelo presento un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 87%, de la variabilidad de los factores estudiados.

**Tabla 19.** Análisis de varianza de actividad antimicrobiana (*Enterobacterias*)

Factor	R: 0,87452 R-adj: 0,78669				
	SC	GL	CM	F-valor	P-valor
(1)Organoarcilla (g/100g)(L)	0.06259	1	0.06259	0.10714	0.750906
Organoarcilla (g/100g)(Q)	6.02975	1	6.02975	10.32143	0.010613
(2)Aceite esencial (g/100g)(L)	1.56481	1	1.56481	2.67857	0.136134
Aceite esencial (g/100g)(Q)	20.05049	1	20.05049	34.32143	0.000241
(3)Almidón (g/100g)(L)	0.56333	1	0.56333	0,96429	0.351769
Almidón (g/100g)(Q)	5,51858	1	5,51858	9,44643	0.013279
1L por 2L	10.09827	1	10.09827	17.28571	0.002456
Falta de ajuste	0.25037	1	0.25037	0.42857	0.529064
Puro error	5.25778	9	0.58420		
Total SS	43.89827	17			

Donde: SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, los términos en rojo son significativos bajo un  $p \leq 0,05$

En la figura 13 (A1, A2), se observó que la mayor inhibición de las enterobacterias se da en concentraciones mayores de aceite esencial de romero ( $\geq 0,30$  g/ 100 g) y organoarcilla ( $\geq 0,50$  g/ 100 g). Pelissari et al., (2009) mencionan que la actividad antibacteriana del aceite de romero en discos de película son buenos para inhibir bacterias gram negativas (*Enterobacterias*)



**Figura 13.** Gráficas de superficie de respuesta y contorno de *enterobacterias*.



Los coeficientes de regresión para el modelo polinomial y gráfica de Pareto se encuentran en el anexo 13 y 14 respectivamente. La ecuación ajustada para este modelo matemático es presenta en la ecuación 21, la interacción lineal entre la organoarcilla y el aceite esencial de romero disminuye 79,444 (10 UFC/g) de *enterobacterias* en las biopelículas.

Ecuación de la figura 13 (A<sub>1-2</sub>)

$$\text{Enterobacterias} = E - 51,422 - 40,806 OA + 30,694 OA^2 AR + 54,167 AR - 223,889 AR^2 + 19,717 AM - 1,661 AM^2 - 79,444 OA * AR \dots \dots \dots (Ec. 21)$$

Donde:

AO: Organoarcilla ( g/100g)

AR: Aceite esencial de romero ( g/100g)

AM: Almidón de mandioca (g/100g)

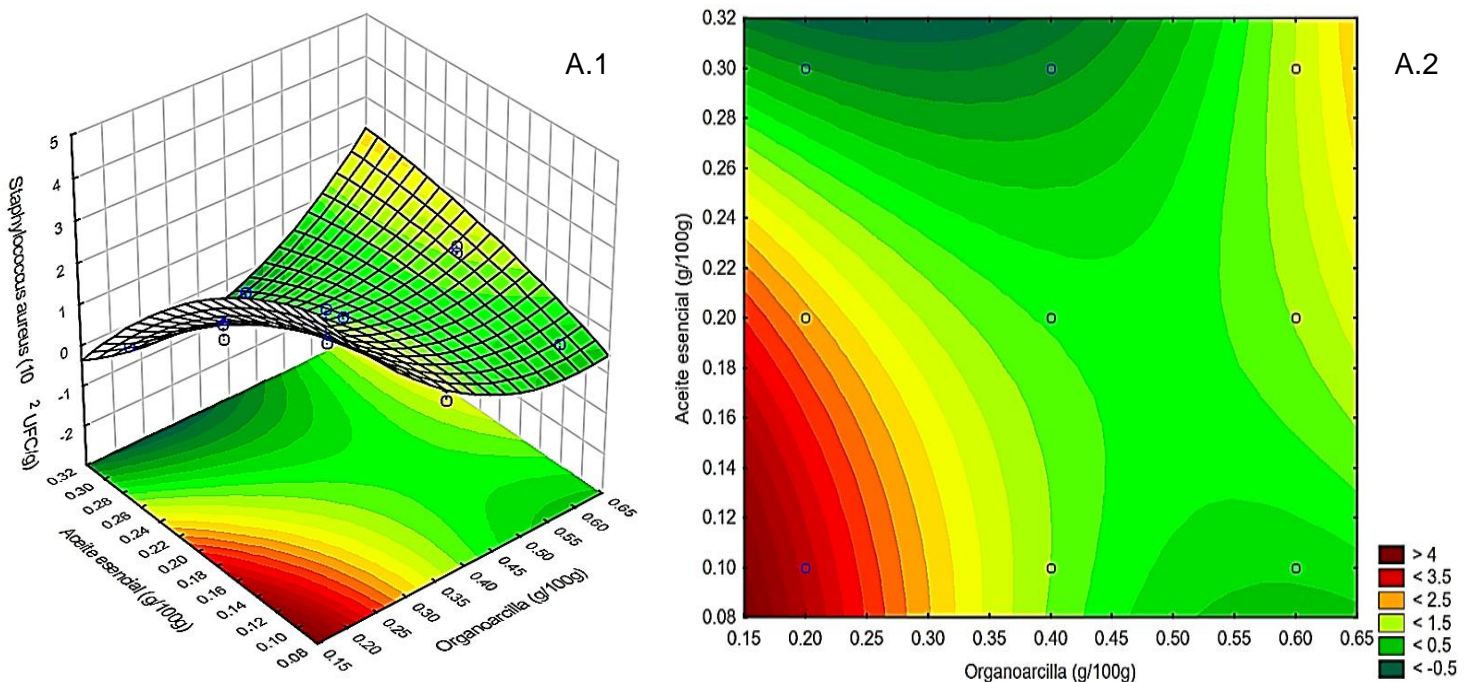
En la tabla 20 se presenta el analisis de varianza realizado para la actividad antimicrobiana (*S. Aureus*), donde se observó significancia en la interacción lineal. Este modelo presento un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 97% de la variabilidad de los resultados con los factores estudiados.

**Tabla 20.** Análisis de varianza de actividad antimicrobiana (*S. Aureus*)

Factor	R: 0,97569 R-adj: 0,95867				
	SC	GL	CM	F-valor	P-valor
(1)Organoarcilla (g/100g)(L)	2.40606	1	2.406059	43.02985	0.000104
Organoarcilla (g/100g)(Q)	3.00444	1	3.004444	53.73134	0.000044
(2)Aceite esencial (g/100g)(L)	5.53068	1	5.530681	98.91045	0.000004
Aceite esencial (g/100g)(Q)	0.60840	1	0.608400	10.88060	0.009251
(3)Almidón (g/100g)(L)	0.45630	1	0.456300	8,16045	0.018883
Almidón (g/100g)(Q)	0.03380	1	0.033800	0.60448	0.456824
1L por 2L	5.27468	1	5.274678	94.33209	0.000005
Falta de ajuste	0.03067	1	0.030670	0.54851	0.477804
Puro error	0.50324	9	0.055916		
Total SS	21.96249	17			

Donde: SC: Suma de cuadrados ,GL: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, los términos en rojo son significativos bajo un  $p \leq 0,05$

En la figura 14, se observó que la mayor inhibición de los *S. aureus* se da en las concentraciones mayores de aceite esencial de romero ( $\geq 0,30$  g/ 100 g) y organoarcilla ( $\geq 0,50$  g/ 100 g).



**Figura 14.** Gráficas de superficie de respuesta y contorno de *Staphylococcus aureus*

Los coeficientes de regresión para el modelo polinomial y gráfica de Pareto se encuentran en el anexo 15 y 16 respectivamente. La ecuación ajustada para el modelo matemático es representada en la ecuación 22, la interacción lineal entre la organoarcilla y el aceite esencial de romero presentaron un efecto positivo, aumentando en 57,41 ( $10^2$  UFC/g) la actividad inhibidora de *S. aureus* en las biopelículas.

Ecuación de la figura 14 (A<sub>1-2</sub>)

$$S. Aureus = -31,056 OA + 21,667 OA^2 - 14,156 AR - 39 AR^2 + 57,417 OA * AR \dots \dots \dots (Ec. 22)$$

Donde:

OA: Organoarcilla ( g/100g)

AR: Aceite esencial ( g/100 g)

AM: Almidón de mandioca (g/100g)

Abdollahi, Rezaei y Farzi (2012) mencionaron que la actividad antibacteriana del aceite esencial de romero en discos de película son buenos para inhibir bacterias grampositivas (*L. monocytogenes*, *S. agalactiae*) que sus contrapartes gramnegativas, que suelen ser considerablemente más resistentes a los agentes antibacterianos; el presente estudio tuvo una mayor inhibición a las bacterias gramnegativas que a las grampositivas, pero ambas presentaron rangos inferiores a lo reportado por Pelissari *et al.*, (2009) que obtuvieron una mayor proliferación de microorganismos en la parte adyacente a la película con aceite esencial de orégano, donde *B. cereus* presentó la mayor inhibición para todas las concentraciones, mientras que *S. enteritidis* presentó la más baja.

Souza *et al.*, (2013) reportaron una actividad antimicrobiana basada en sus películas compuestas de almidón de mandioca, aceite esencial de canela y organoarcilla, donde el crecimiento de microorganismos mediante el método de difusión de disco, en sus tres contenidos

diferentes de aceite de canela (0,4 g, 0,5 g y 0,6 g), presentaron una mejor inhibición en la biopelícula con mayor contenido de aceite esencial.

La mayoría de los estudios que investigan la acción de los aceites esenciales (AE) contra los organismos que deterioran los alimentos y los patógenos transmitidos por los alimentos están de acuerdo en general, que los AE son ligeramente más activos contra las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas (Burt, 2004). Este resultado puede estar relacionado con la presencia de una membrana externa adicional que rodea la pared celular en bacterias Gram-negativas, que restringe la difusión de compuestos hidrófobos a través de su cubierta de lipopolisacáridos (Zivanovic, Chi, y Draughon, 2005, Šuput *et al.*, 2016).

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

La obtención de almidón de mandioca, permitió tener un polímero apto y de buena calidad para el uso de biopelículas activas para aplicaciones alimentarios. Es posible obtener películas biodegradables es buenas condiciones utilizando el almidón de mandioca, reforzado con organoarcilla y aceite esencial de romero. Se eligió al 4to tratamiento mediante el diseño estadístico  $L_4 (2^3)$ , ya que obtuvo el valor más alto de temperatura de gelatinización y estadísticamente fue significativo, independientemente de las otras variables de respuesta.

Los valores promedios obtenidos en sus propiedades fisicoquímicas de almidón de mandioca tales como humedad 4,62%, proteínas 1,91%, grasa 1,15, ceniza 0,13%, fibra 0,57%, carbohidratos 92,18, amilosa 22,13% y amilopectina 69,48 %.

La morfología del gránulo de almidón de mandioca fue de forma esférica con algunas terminaciones truncadas, el tamaño de los gránulos se encuentra entre 4.944 a 14.84  $\mu\text{m}$ . Las propiedades térmicas que presentó mediante la prueba de DSC fue de 52,98 °C ( $T_0$ ), 59,8 °C ( $T_p$ ), 67,64 °C ( $T_f$ ) y 10,52  $\Delta H$ .

La caracterización de la organoarcilla muestra un pico característico en  $2\theta = 7,52^\circ$  ( $d_{001} = 11,768 \text{ \AA}$  o 1,17 nm), con un espacio interlaminar de 1,17 nm la organoarcilla fue un refuerzo importante para mejorar las propiedades mecánicas en las biopelículas.

El almidón a concentraciones de 6 a 7 g/100g presentó mejores resultados en las propiedades mecánicas, solubilidad y permeabilidad de vapor de agua por su estructura hidrofílica. Las películas producidas a partir de soluciones más concentradas de organoarcilla de 0,4 a 0,6 g/100g ayudan a obtener películas homogéneas con mejor resistencia a la fuerza de ruptura y al % de elongación. También ayudan a mejorar las propiedades de barrera como la PVA y solubilidad. El aceite esencial de romero fue incorporado exitosamente en las biopelículas ayudando a potenciar la actividad antimicrobiana contra las *enterobacterias* y *Staphylococcus*

*aureus*. A mayor contenido de aceite esencial de 0,3 g/100g mejor es la inhibición de microorganismos. En las propiedades mecánicas ayuda a incrementar su % de elongación, pero disminuye su fuerza de ruptura.

## **5.2 Recomendaciones**

Esta investigación realizada permite hacer las siguientes recomendaciones, según los análisis realizados de sus resultados aún hay aspectos que son necesarios investigar.

- Estudiar el efecto reológico oscilatorio de las soluciones de las biopelículas (solución filmógena).
- Realizar prueba de temperatura de transición vitria Tg, Tc y Tm (°C) para verificar el comportamiento de transiciones de fase del biopolímero.
- Realizar microscopia electrónica de barrido (MEB) en la biopelícula para justificar las posibles interacciones de almidón, aceite esencial y la organoarcilla.
- Evaluar el tiempo de vida útil de las películas biodegradables en diversas condiciones de humedad relativa.
- Estudiar el efecto sensorial en alimentos frescos recubiertos con biopelícula activa a base de almidón de mandioca reforzado con aceite esencial de romero y organoarcilla.

## REFERENCIAS

- A.O.A.C. (2005) Normas de análisis bromatológico para: Humedad (925.10) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Whashington.
- A.O.A.C. (2005). Normas de análisis bromatológico para: Fibra cruda (985.29) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Whashington.
- A.O.A.C. (2005). Normas de análisis bromatológico para: Cenizas totales (923.03) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Whashington.
- A.O.A.C. (2005). Normas de análisis bromatológico para: Grasas (920.39) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Whashington.
- A.O.A.C. (2005). Normas de análisis bromatológico para: Proteínas (1920.152) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Whashington.
- Abdollahi, M., Rezaei, M., y Farzi, G. (2012).Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(4), 847–853.
- Aguilar, M., San Martín, E., Espinoza, N., Sánchez, M., Cruz, A., Ramírez, E. (2012). Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba. *Sociedad mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*. 25(1). 1-7.
- Ahmed, O., y Dutta, D. K. (2002). In situ generation of metal clusters in interlamellar spacing of montmorillonite clay and their thermal behaviour. *Thermochimica Acta*, 395(1-2),209–216.
- Ahvenainen, R. (2014). Active and intelligent packaging: An introduction - Novel Food Packaging Techniques - 2. *Food Nutr. Sci.*, 64, 7/15
- Albers, A., Melchiades, F., Machado, R., Baldo, J., y Boschi, A. (2002). Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. *Cerâmica*, 48(305), 34–37.

- Anchundia, K., Santacruz, S., y Coloma, J. (2016). Caracterización física de películas comestibles a base de cáscara de plátano (*Musa Paradisiaca*). *Revista Chilena de Nutrición: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Nutricion, Bromatologia Y Toxicologia*, 43(4), 9–9.
- Araujo, P. C. (2008). Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de derivados do grão de quinoa (*Chenopodium quinoa Willdenow*) da variedade “Real” (Tesis de doctorado). (D. F. C. Menegalli, Ed.). Universidade Estadual De Campinas. Retrieved from <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/256477>.
- Araujo de Vizcarrondo, C., Rincón, A. M., Padilla, F. (2004). Caracterización de almidón nativo de *Discorea bulbifera* L. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54(2):241– 245.
- Arenas J. (2006). Usos de la Yuca, Según estudio de corpoica en espinal (Tolima). <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-3254363>.
- Arévalo, V., Azucena, G., Laínez, S.(2018). Formulación y caracterización de una biopelícula comestibles elaborada a partir de almidón de sorgo (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) y yuca (*Manihot esculenta*). (Tesis para el grado de Ingeniero de Alimentos). Universidad el Salvador.
- Aristizábal, J., y Sánchez, T. (2007). *Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Food & Agriculture Org.*
- Arora, A., Padua, G. W. (2010). Review: Nanocomposites in Food Packaging. *Journal of Food Science*, 75(1), R43–R49.
- Assaedi, H., Shaikh, F. U. A., Low, I. M. (2016). Effect of nano-clay on mechanical and thermal properties of geopolymer. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 4(1), 19–28.
- ASTM Standard E96/E96M-05. (2005). Standard test method for water vapor transmission of material. West Conshohocken, PA: ASTM International. doi:10.1520/ E0096\_E0096M-05. [www.astm.org/Standards](http://www.astm.org/Standards).



- ASTM. (1992). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard. D882-91. ASTM, annual book of ASTM. Philadelphia: ASTM. 162–170.
- Avelino, G. (2009). *Desenvolvimento de espumas semi-rígidas de poliestireno com propriedades oxi-biodegradáveis*. (Tesis de doctorado). Universidad Federal de Santa Catarina. Pág. 1-120.
- Averous, L., Boquillon, N. (2004). Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 111–122.
- Azeredo, H. M. C. de. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42(9), 1240–1253.
- Badui, S. (2006) *Química de los Alimentos: Hidratos de carbono*. (pp 82-84). Pearson Educación. ISSN 979-26-0670-5.
- Bae, H., Park, H., Hong, S.; Byun, Y., Darby, D., Kimmel, R., Whiteside, W. (2009). Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. *LWT - Food Science and Technology*, Oxford, v. 42, p. 1179-118.
- Bergaya, F., Lagaly, G., Vayer, M. (2013). Cation and Anion Exchange Chapter 2.11, Handbook of Clay Science. 2nd edition. *Developments in Clay Science*, vol. 5. Elsevier, pp. 333–359.
- Bertan, L. C. (2003). *Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco*. P. Dissertação (Tesis de Maestría) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.
- Borda, A. (2008). *Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis obtidos de amido e de farinha de arroz*. (Tesis de pregrado). Universidad Federal de Santa Catarina.

- Bouberka, Z., Khenifi, A., Mahamed, H., Haddou, B., Belkaid, N., Bettahar, N., Derriche, Z. (2009). Adsorption of Supranol Yellow 4GL from aqueous solution by surfactant treated aluminum/chromium-intercalated bentonite. *J. Hazard. Mater.* 162, 378–385.
- Bragg, W. (1969). The intensity of reflexion of x-Rays by crystals. *Acta Cryst.* A25, 3.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Camacho, M., Vega J., Campos A. (2011). Uso de Nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. V 77, N° 4. 292-305 pp.
- Campo, J. D., Del Campo, J., Amiot, M.-J., Nguyen-The, C. (2000). Antimicrobial Effect of Rosemary Extracts. *Journal of Food Protection*, 63(10), 1359–1368.
- Canevarolo, J. (2003). *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: Artiber.
- Carvalho, O., Avérous, L., Tadini, C. (2011). Mechanical properties of cassava starch-based nano-biocomposites. Food Engineering Laboratory, Department of Chemical Engineering.
- Casarrubias, M., Méndez, G., Rodríguez, L., Sánchez, M., Bello, L. (2012). Diferencias estructurales y reológicas entre almidones de frutas y cereales. *Agrociencia*. 1-12.
- Chanamai, R., McClements, D. (2001). Depletion flocculation of beverage emulsions by gum Arabic and modified starch. *Journal of food Science*. 66(3): 1024-1027.
- Charles, A., Chang, Y., Ko, W., Sriroth, K., Huang, T. (2005). Influence of amilopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches. *Agricultural and Food Chemistry*. 53:2717-2725.
- Charles, A., Huang, T., Lai, P., Chen, C., Lee, P., Chang, Y. (2007). Study of wheat flour–cassava starch composite mix and the function of cassava mucilage in Chinese noodles. *Food Hydrocolloids* 21: 368-378.

- Chen, B., Evans, J. (2005). Thermoplastic starch–clay nanocomposites and their characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 61(4), 455–463.
- Chivrac, F., Pollet, E., Dole, P., Avérous, L. (2010). Starch-based nano-biocomposites: Plasticizer impact on the montmorillonite exfoliation process. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 941–947.
- Coles, R., McDowell, D., y Kirwan, M. J. (2003). *Food Packaging Technology*. CRC Press.
- De los Ángeles, A. (2016). *Obtención de un biopolímero plástico a partir del almidón de malanga (Colocasia esculenta), por el método de polimerización por condensación*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. (Tesis de pregrado). 1- 79 pp.
- Defloor, I., Dehing, I., Delcour, J. (1998). Physico-chemical properties of cassava. *Starch/Stärke*, 50, 58–64.
- Díaz, R. (2015). Films biodegradables antimicrobianos a base de almidón y gelatina. (Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos). Universidad Politécnica de Valencia. 21.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1990) Raíces, Tubérculos, Plátanos y Bananas en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Roma.
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., y Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates - ScienceDirect. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 8.
- Flores, S., Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., Gerschenson, L. (2007). Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2), 257–265.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2007). Global cassava market study. Business opportunities for the use of cassava. Proceedings of the validation forum on the global cassava development strategy. Volume 6.

- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research: PTR*, 21(10), 989–994.
- García, O., Pinzón, F., Sánchez, L. (2012). Extracción y propiedades funcionales del almidón de yuca, *Manihot esculenta*, variedad ICA, como materia prima para la elaboración de películas comestibles. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol:11, No. 1, p. 13-21.
- Hanusova, K., Dobias, J., Voldrich, M. (2012). Assessment of functional properties and antimicrobial efficiency of polymer films with lacquer layer containing natamycin in cheese packaging. *Journal of Food and Nutrition Research*.v.51,n.3,p.145-155.
- Hernández, M., Torruco, J., Chel, L., Betancur, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 28 (3), 718-726.
- Herald, T. J., Obuz, E., Twombly, W. W., Rausch, K. D. (2002). Tensile Properties of Extruded Corn Protein Low-Density Polyethylene Films. *Cereal Chemistry Journal*, 79(2), 261–264.
- Hillocks, R., Thresh., Bellotti, A. (2002). Cassava: Biology, Production and Utilization. CABI.
- Holah, J. T., Kearney, L. R. (1992). Introduction to Biofilms in the Food Industry. *In Biofilms. Science and Technology* (pp. 35–41).
- Howeler, R. H., Litaladio, N., Thomas, G., (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. Save and Grow: Cassava: a Guide to Sustainable Production Intensification. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Jiménez, E., Martínez, S. (2016). *Obtención y caracterización física y química de almidón de yuca (Manihot esculentum) variedad Guayape*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 1-116.

- Jyothi, A. N., Kiran, K. S., Wilson, B., Moorthy, S. N., Nambisan, B. (2007). Wet Storage of Cassava Starch: Use of Sodium Metabisulphite and Acetic Acid and the Effect on Starch Properties. *Starch - Stärke*, 59(3-4), 141–148.
- Kádár, F., Százdí, L., Fekete, E., Pukánszky, B. (2006). Surface characteristics of layered silicates: Influence on the properties of clay/polymer nanocomposites. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 22(18), 7848–7854.
- Karam, L., Ferrero, C., Martino, M., Zaritzky, N. Grossmann, M. (2006). Thermal, microstructural and textural characterization of gelatinized corn, cassava and yam starch blends. *International Journal of Food Science and Technology* 41: 805-812.
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., Tadini, C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1088–1094. doi:10.1016/j.lwt.2010.02.014.
- Laurent, J., Argüello, D. (2001). Tecnología poscosecha de la yuca fresca parafinada (*Manihot esculenta Crantz*) para exportación en Costa Rica.
- Lee, J., Lim, Y. T., Ok Park, O. (2000). Thermal characteristics of organoclay and their effects upon the formation of polypropylene/organoclay nanocomposites. *Polymer Bulletin*, 45(2), 191–198.
- Liao, H.-T., Wu, C.-S. (2009). Preparation and characterization of ternary blends composed of polylactide, poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and starch. *Materials Science and Engineering: A*, 515(1-2), 207–214.
- Leja, K., Lewandowicz, G. (2010). Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers. *Polish J. of Environ.*, 255–266.
- Léotard, G., Duputié, A., Kjellberg, F., Douzery, E. J. P., Debain, C., de Granville, J.-J., McKey, D. (2009). Phylogeography and the origin of cassava: new insights from the northern rim of the Amazonian basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1), 329–334.

- Lertphanich, S., Wansuksri, R., Tran, T., Da, G., Nga, L. H., Dufour, D., Sriroth, K. (2013). Comparative study on physicochemical properties of ensete and water caltrop with other root, tuber, and legume starches. *Starch - Stärke*, 65(11-12), 1038–1050.
- Lin, J., Kao, W., Tsai, Y. (2013). Effect of Granular characteristics on pasting properties of starch blends. *Carbohydrate Polymers*. 98(2): 1553-1560.
- López-Rubio, A., Almenar, E., Hernandez-Muñoz, P., Lagarón, J. M., Catalá, R., Gavara, R. (2004). Overview of Active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Applications. *Food Reviews International*, 20(4), 357–387.
- Lubbe, A., Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products* 34: 785 - 801.
- Ma, X., Yu, J., Wang, N. (2007). Fly ash-reinforced thermoplastic starch composites. *Carbohydrate Polymers*, 67, 32-39.
- Mali, S., Eiras, M., Yamashita, F. (2010). Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização Starch films: production, properties and potential of utilization. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156.
- Mali, S., Grossmann, M., Garcia, M., Martino, M., Zaritzky, N. (2005). Mechanical and thermal properties of yam starch films. *Food Hydrocolloids*, 19(1), 157–164.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 379–386.
- Martínez, S. (2015). Desarrollo y caracterización mecánica, térmica y estructural de nanocompuestos de almidón reforzados con nanopartículas de almidón. (Tesis para Ingeniero). Pontificia Universidad Católica del Perú. 1-11.

- Martins De Sousa, G. (2012). Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca (Tesis de maestría). Universidade de Federal de Goias.
- Mathew, A., Dufresne, A. (2002). Morphological Investigation of Nanocomposites from Sorbitol Plasticized Starch and Tunicin Whiskers. *Biomacromolecules*, 3(3), 609–617.
- Maximow, S. (2008). *Análisis calorímetro y de difracción de rayos x de alecciones base cobre, obtenidas por aleado mecánico*. (Tesis de Ingeniero Civil Mecánico). Universidad de Chile. Santiago. 1-98 pág.
- Medina, J., Salas, J. (2007). Caracterización morfológica del granulo de almidón nativo: Apariencia, forma, tamaño y distribución. *Revista de ingeniería*. 1-8 pág
- Mehyar, G., Han, J. (2006). Physical and Mechanical Properties of High-amylose Rice and Pea Starch Films as Affected by Relative Humidity and Plasticizer. *Journal of Food Science*, 69(9), E449–E454.
- Mendoza, G., Rodríguez, J. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: una nueva revolución en curso. Perfiles latinoamericanos. Mexico.
- Ministerio de Agricultura y Riego [MINAGRI], (2017)
- Miramont, S. (2012). Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos. (Tesis de Maestría). Tecnología de Alimentos. Pág. 1-109.
- Montgomery, D. (1991). Métodos y diseños de superficie de respuesta: Diseños y análisis de experimentos. España: Iberoamericana.
- Moorthy, S. (2002). Tuber crop starches. Tech Bulletin No. 18 CTCRI, Trivandrum
- Moorthy, S. (2004). Starch in food: structure, function and applications. Cambridge: Publishing Limited Woodhead.

- Nara, S., Komiya, T. (1983). Studies on the Relationship Between Water-saturated State and Crystallinity by the Diffraction Method for Moistened Potato Starch. *Starch - Stärke*, 35(12), 407–410.
- Novelo, L., Betancur, D.(2005). Chemical and Functional Properties of Phaseolus lunatus and Manihot esculenta Starch Blends. *Starch/Starke* (431-441).
- Nuwamanya, E., Baguna, Y., Emmambux, M., Taylor, J. Rubaihayo, P. (2009). Physicochemical and functional characteristics of cassava starch in Ugandan varieties and their progenies. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* Vol. 2(1). pp. 01-011.
- Ochoa, E., Martínez, G., Saucedo, S., Montañez, J., Rojas, R., De León, M., Rodriguez, R y Aguilar, C. (2013). Improvement of shelf life quality of green bell peppers using edible coating formulations. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(6), 2448-2451.
- Ojeda, A., Van, C., Elechosa, M., Juárez, M. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* .189 -195 p.
- Oladunmoye, O. O., Aworh, O. C., Maziya-Dixon, B., Erukainure, O. L., Elemo, G. N. (2014). Chemical and functional properties of cassava starch, durum wheat semolina flour, and their blends. *Food Science & Nutrition*, 2(2), 132–138.
- Olivato, J. B., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., Nobrega, M. M., Scapin, M. R. S., Eiras, D., Pessan, L. A. (2011). Compatibilisation of starch/poly(butylene adipate co-terephthalate) blends in blown films. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(9), 1934–1939.
- Oliveira, L. (2009). *Obtenção e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de misturas de amido de mandioca e extrato protéico de Soja*. (Tesis de Maestría). Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Tecnologia de Alimentos. Seropédica, Rio de Janeiro.



- Olsen, K., Schaal, B. (1999). Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5586–5591.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2009). Yuca para la seguridad alimentaria y energética. [http://www.paho.org/bol/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1058:yuca-seguridad-alimentaria-energetica&Itemid=48](http://www.paho.org/bol/index.php?option=com_content&view=article&id=1058:yuca-seguridad-alimentaria-energetica&Itemid=48).
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2017) Fomento del consumo mundial de frutas y verduras. Retrieved August 30, 2017, from :<http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/index1.html>.
- Ortiz, V., Velazco, R., Fernández, A., Enriquez, M., Roa, D. (2015). Obtención de una película a base de almidón hidroxipropilado producida por extrusión soplada. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 13 No 1. 90-98.
- Oses, J. (2006). *Desarrollo caracterización y aplicaciones alimentarias de recubrimientos comestibles basados en proteína de suero de leche, almidón y goma mezquita*. Universidad Pública de Navarra. (Tesis de pregrado).
- Pampa, N. (2007). *Estudios de nanocompuestos de poli(tereftalato de butileno) reciclado e argila montmorilonita orgánicamente modificada*. (Tesis de Doctorado en Química). Universidad Estadual de Campinas.
- Park, H., Li, X., Park, C., Cho, W. (2003). Environmentally friendly polymer hybrids Part I mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Journal of Materials Science*, v. 38, p. 909–915.
- Pasquel, A. (2001). Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. *Revista Amazónicas de Investigación Alimentaria*, v. 1. N° 1. 1-8.

- Pelissari, F., Grossmann, M., Yamashita, F., Pineda, E. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7499–7504.
- Pelissari, M. (2013). *Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido e farinha de banana reforçados com nanofibras de celulose*. (Tesis de doctorado). Unicamp. Brasil.
- Peña, E. (2017). *Extracción y Caracterización fisicoquímica y funcional de almidones de cinco variedades de papas nativas procedentes de ilave (Puno)*. (Tesis de pregrado). Universidad Agraria La Molina (UNALM).
- Perugachi, C. (2006). *Modificación a nivel nanomolecular de las propiedades de las arcillas pertenecientes al grupo ancon de la península de Santa Elena*. (Tesis de grado).
- Quintero, C., Falguera, V., Muñoz, A. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. Pag: 93-118.
- Ramírez, J. (2007). *Industrialización de la yuca, obtención de almidón nativo y aplicaciones*. Universidad del Valle. Colombia.
- Ramos, A. (2013). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosoles de Rosmarinus officinalis y Taraxacum officinale frente a microorganismos patógenos*. (Tesis inédita de Microbiólogo Industrial).
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C. y Jacobsen, S. (2003). Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). 179-189p.
- Ríos, K. (2014). *Análisis Comparativo de las propiedades fisicoquímicas y nutricionales de Almidón obtenidas a partir de dos especies de Malanga (Colocasia Antiquorum y Colocasia esculenta) Cultivadas en el estado de Oaxaca*. (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca.

- Rocha, G., Farias, M., de Carvalho, C., Ascheri, J., Galdeano, M. (2014). Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. *Polímeros*, 24(5), 587–595.
- Rodrigues, M., Lemma, A. (2014). *Experimental Design and Process Optimization*. CRC Press.
- Rodríguez, R., San Martín, M., González de la Cruz, G. (2001). Calorimetría diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada. *Superficies y vacío*, (13), 61-65.
- Rodríguez-Sandoval, E., Lascano, A., Sandoval, G. (2012). Influence of the partial substitution of wheat flour for quinoa and potato flour on the thermomechanical and bread making properties of dough. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 199–207.
- Salam, M. A., Kosa, S. A., Al-Beladi, A. (2017). Application of nanoclay for the adsorptive removal of Orange G dye from aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 469–477.
- Sanz, A. (1995). *Desarrollo de un modelo teórico para interpretación de difractogramas de Rayos X de alta resolución*. (Tesis de Doctorado). Universidad Politécnica de Madrid.
- Silva, P., Silva, W. (2016). Caracterização das Soluções Filmogênicas de Amido de Fruta-pão (*Artocarpus Altilis*) e dos seus Filmes Biodegradáveis. Brasil.
- Smits, A., Kruiskamp, P., Van, J., Vliegenthart, J. (2003). The influencia of various small plasticiser and malto-oligosaccharides on the retrogradation of (partly) gelatinised starch. *Carbohydrate Polymers*, 51, 417-424.
- Sin, H., Yosof, S., SHeikh, N. Rahman, R. (2006). Optimization of hot water extraction for sapidilla juice using response surface methodology. *J. Food Eng.* 74:352-358p.
- Sobral, P. (2000). Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v:35, nº6.

- Sonaka, L. (2007). confecção de filmes biodegradáveis por extrusão blendas de amido termoplástico e polibutileno succinato co-adipato (PBSA) (Engenheira de Alimentos). (F. Yamashita, Ed.). Universidade Estadual de Londrina. Retrieved from <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp027740.pdf>.
- Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V., Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 346–352.
- Souza, A., Benze, R., Ferrão, E., Ditchfield, C., Coelho, A., Tadini, C. (2012). Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *Food Science and Technology* 46:
- Souza, S. M. A. de. (2001). *Elaboração e caracterização de filmes comestíveis biodegradáveis a base de proteínas miofibrilares de origem bovina* (Tesis de doctorado). Unicamp. 9305.
- Suárez, L., Meredos, V. (2011). Cultivo de yuca (*Manihot Esculenta Crantz*). Vol. 32.(3). p: 27-35.
- Suárez, M., Barcina, L. M., Llavona, R., Rodríguez, J., Salvadó, M. A., Pertierra, P., García-Granda, S. (1998). Synthesis, crystal structure and intercalation behaviour of hafnium phosphate dihydrogenphosphate dihydrate. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (1), 99–102.
- Šuput, D., Lazić, V., Pezo, L., Markov, S., Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S. (2016). Characterization of Starch Edible Films with Different Essential Oils Addition. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(4), 277–286.
- Thiré, R. M. S. M., Simão, R. A., y Andrade, C. T. (2003). High resolution imaging of the microstructure of maize starch films. *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 149–158.

- Torres, R. A., Montero, C. P., y Duran, L. M. (2013). Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). *Revista Lasallista de Investigacion*, 10(2), 52–61.
- Trujillo, C.(2014). *Obtención de películas biodegradables a partir de la almidón de yuca (Manihot esculenta Crantz) doblemente modificado para uso en empaque de alimentos.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Amazónica de Madre Dios. 1-147.
- Uskarci, T. (2006). *Behaviour of bentonite suspensions in non-aqueous media.* (Tesis de postgrado). Middle east technical university.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., y González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(6), 496–511.
- Vázquez, M., Guerrero, J. (2013). Recubrimientos de frutas con biopelículas. Temas selectos de Ingeniería de alimentos. N° 7 (2). 1-9 pp.
- Vargas, P., Hernández, D. (2012). Harina y almidones de yuca, ñame, camote y ñampí: propiedades funcionales y posibles aplicaciones en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*. Vol 25 N° 6. 1-9.
- Villada, H. S., y Joaqui, D. F. (2013). Propiedades ópticas y permeabilidad de vapor de agua en películas producidas a partir de almidón. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 59-68.
- Villamán, M. (2007). *Elaboración y caracterización de films comestibles basadas en mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano* (Tesis de pregrado). Universidad de Chile. Pág.: 1-72
- Wang, L., Holmes, L., Kerry, J., Kerry, J. (2007). Assesment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. 42(9).

- White, E. (1959). Testimonios selectos 5: Capitulo 7- El valor de la vida al aire libre. Disponible:  
[http://media2.egwwritings.org/swf/es\\_5TS/files/assets/se0/page3.html](http://media2.egwwritings.org/swf/es_5TS/files/assets/se0/page3.html)
- Wilhelm, H.-M., Sierakowski, M.-R., Souza, G., Wypych, F. (2003). Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52(2),m101–110.
- Yam, K., Takhistov, P., Miltz, J. (2005). Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science*, 70(1).
- Zeng, Q., Yu, A., Lu, G., Paul, D. (2005). Clay-based polymer nanocomposites: research and commercial development. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(10), 1574–1592.
- Zivonavic, S., Chi, S., Draughon, A. (2005). Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. *Journal of Food Science*, 70(1), 45-51.

## ANEXOS

### Anexo 1. Contenido de amilosa

#### Contenido de amilosa

El contenido de amilosa aparente se determinó por (Anchundia, Santacruz, & Coloma, 2016). Se mezclaron 80 mg de almidón con 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Se calentó la mezcla en un baño maría a 85 °C por 30 min. Luego se transfirieron los tubos a una estufa a 100 °C por 1 hora. Posteriormente se tomaron 0.5 ml de la solución y se añadió aproximadamente 25 ml de agua destilada y 1 ml de solución de lugol (I<sub>2</sub>/IK) y se aforó hasta 50 ml con agua destilada.

Finalmente, por medio de un espectrofotómetro se determinó la absorbancia a 635 nm y se calculó el valor azul y el porcentaje de amilosa aparente presente en el almidón, según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Valor azul} = \frac{\text{Absorbancia}}{2 \times \text{g de solución} \times \text{mg almidón}} \times 100$$

$$\% \text{ de amilosa} = (28.414 \times \text{valor azul}) - 6.218$$

Anexo 2. Equipos



Microscopía electrónica de barrido



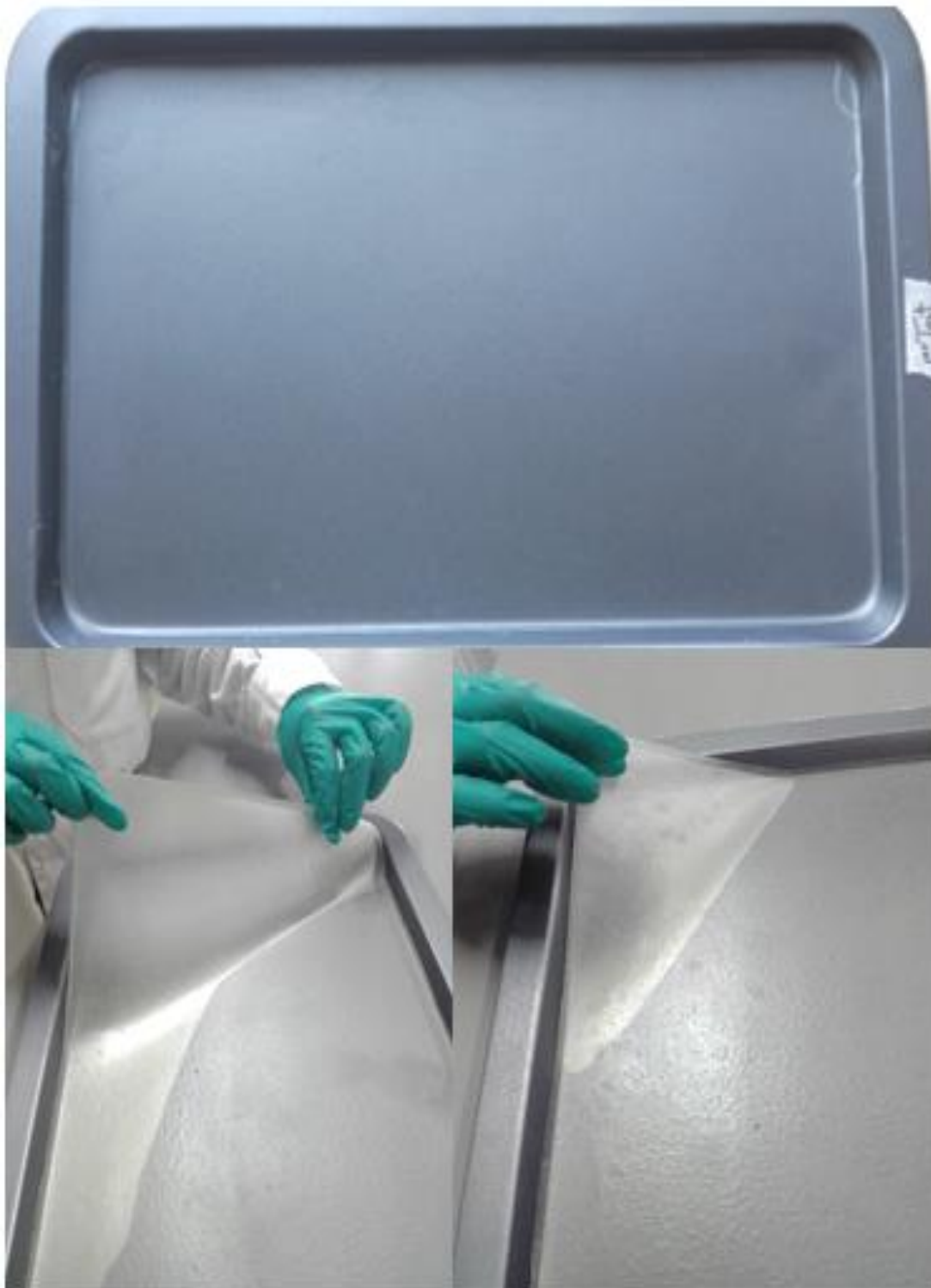
Difracción de rayos X para el análisis de la organoarcilla



Texturometro



**Anexo 3.** Biopelícula de almidón de mandioca, aceite esencial y organoarcilla



**Anexo 4. Acondicionamiento de las biopelículas**



**Trat. 1**



**Trat. 2**



**Trat. 3**



**Trat. 4**



**Trat. 5**



**Trat. 6**



**Trat. 7**



**Trat. 8**

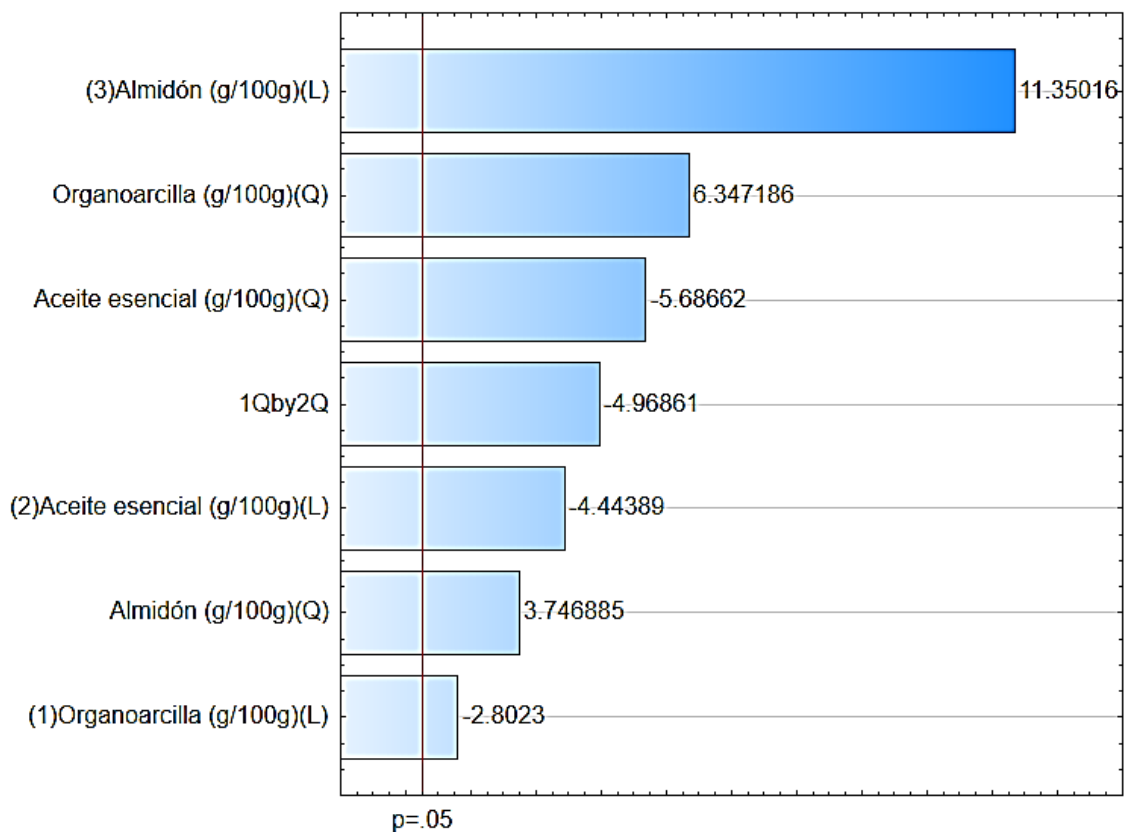


**Trat. 9**

**Anexo 5.** Coeficiente de regresión lineal de fuerza de ruptura (MPa)

FACTOR	Regress Coef,	Std, Err	t(9)	p	(-)95% Cnf,Limit	(+)95% Cnf,Limit
Media/Intersección	21,129	8,317	2,540	0,0317	2,312	39,944
(1) Organoarcilla (g/100g)(L)	20,692	3,517	5,881	0,0002	12,734	28,649
Organoarcilla (g/100g)(Q)	-21,446	4,526	-4,737	0,0011	-31,686	-11,206
(2) Aceite esencial (g/100g)(L)	-44,067	7,035	-6,263	0,00015	-59,983	-28,150
Aceite esencial (g/100g)(Q)	123,714	18,105	6,832	0,00007	82,756	164,672
(3) Almidón (g/100g)(L)	-7,984	2,876	-2,775	0,0215	-14,492	-1,476
Almidón (g/100g)(Q)	0,772	0,241	3,201	0,0108	0,226	1,317
1 Q por 2Q	-132,398	26,647	-4,968	0,0007	-192,677	-72,118

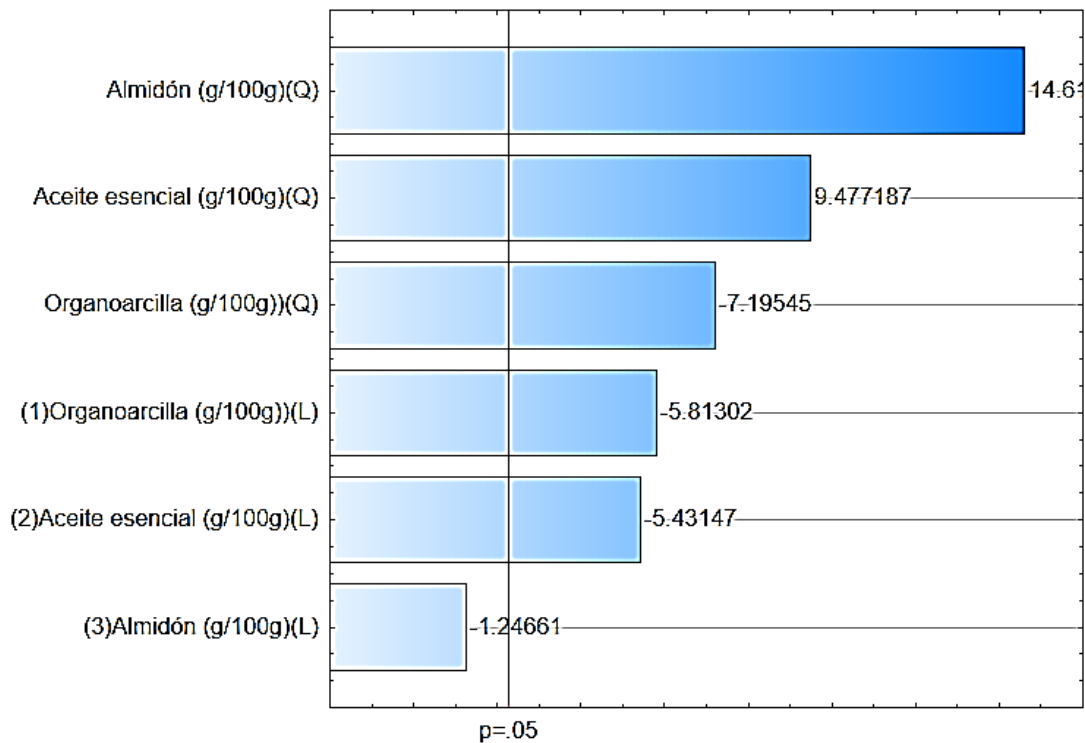
**Anexo 6.** Gráfica de Pareto de fuerza de ruptura (MPa)



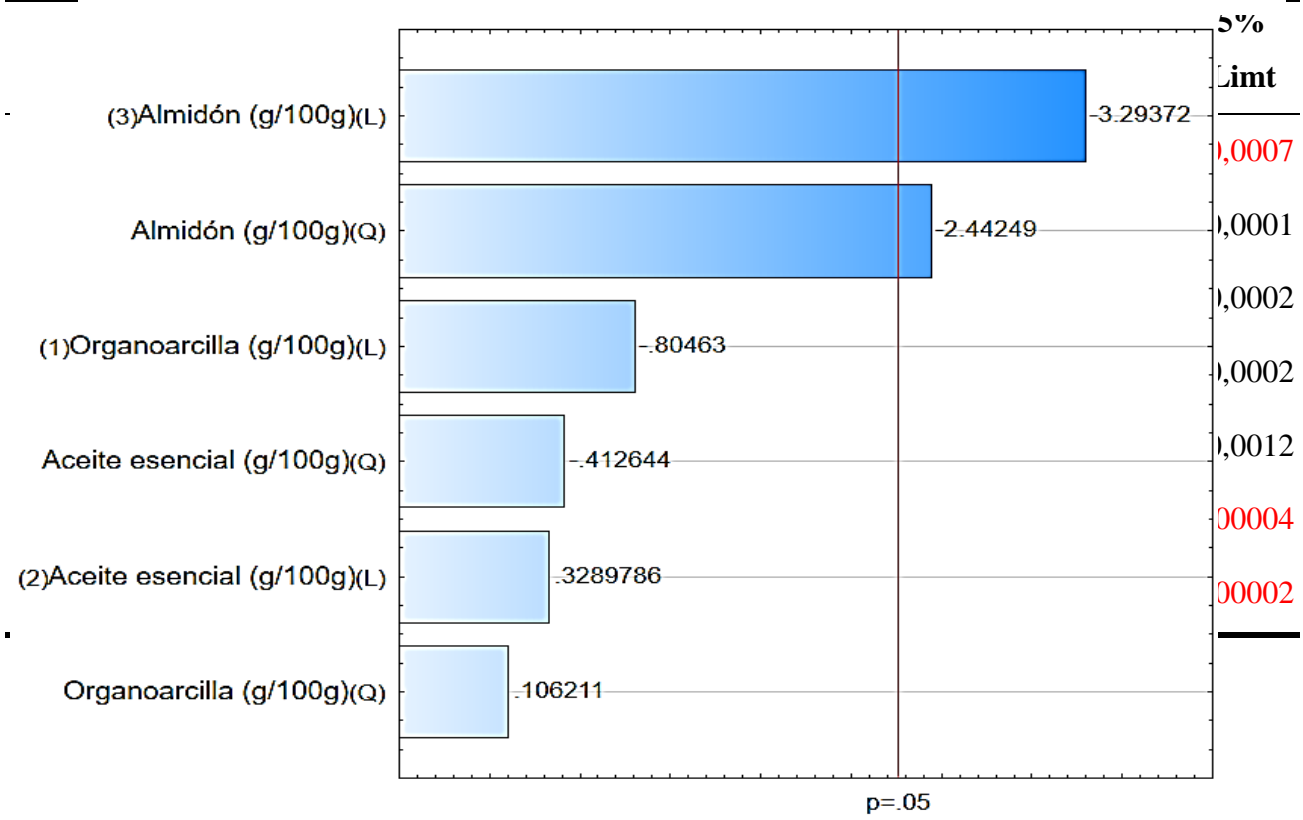
**Anexo 7. Coeficiente de regresión lineal de la elongación (%)**

FACTOR	Regress			p	(-)95%	(+)95%
	Coef,	Std, Err	t(9)		Cnf,Limit	Cnf,Limit
Media/Intersección	-1,080,321	80,703	-13,386	0,000	-1,262,884	-897,758
(1) Organoarcilla (g/100g)(L)	-361,688	45,483	-7,952	0,000	-464,578	-258,797
Organoarcilla (g/100g)(Q)	404,896	56,271	7,195	0,000	277,602	532,190
(2) Aceite esencial (g/100g)(L)	782,683	90,967	8,604	0,000	576,902	988,464
Aceite esencial (g/100g)(Q)	-2,133,167	225,084	-9,477	0,000	-2,642,343	-1,623,990
(3) Almidón (g/100g)(L)	393,080	27,041	14,536	0,000	331,908	454,252
Almidón (g/100g)(Q)	-32,892	2,251	-14,613	0,000	-37,983	-27,800

**Anexo 8. Gráfica de Pareto de elongación (%)**



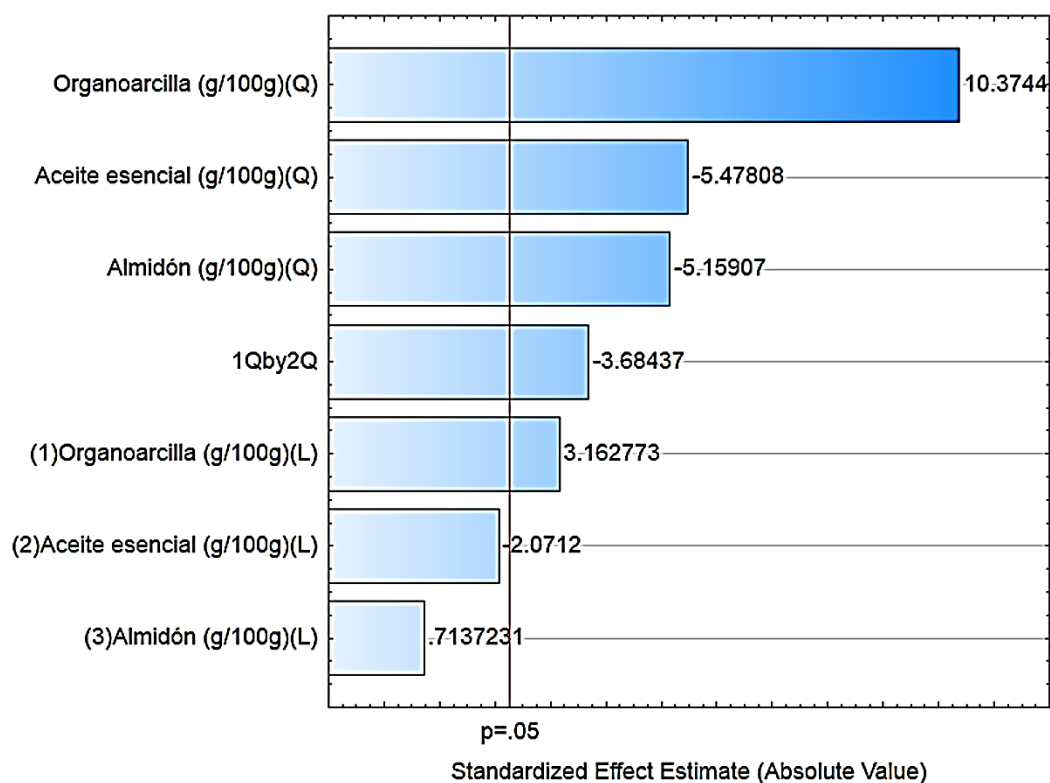
**Anexo 9. Coeficiente de regresión de PVA**  
**Anexo 10. Gráfica de Pareto de PVA**



### Anexo 11. Coeficiente de regresión de ISA

Factor	Regress Coef.	Std.Err.	t(9)	<u>P</u>	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Media/Intersección	554,981	49,277	11,2624	0,000001	443,507	666,454
(1)Organoarcilla (g/100g)(L)	223,417	20,841	10,7198	0.000002	176,270	270,563
Organoarcilla (g/100g)(Q)	-240,357	26,816	-8,9631	0,000009	-301,020	-179,694
(2)Aceite esencial (g/100g)(L)	-238,333	41,682	-5,7178	0,000288	-332,626	-144,040
Aceite esencial (g/100g)(Q)	673,571	107,264	6,2795	0,000144	430,920	916,223
(3)Almidón (g/100g)(L)	-178,593	17,043	-10,4784	0,000002	-217,149	-140,037
Almidón (g/100g)(Q)	-14,970	1,429	10,4748	0,000002	11,737	18,203
1Q por 2Q	-581,633	157,8647	-3,6844	0,005041	-938,747	-224,518

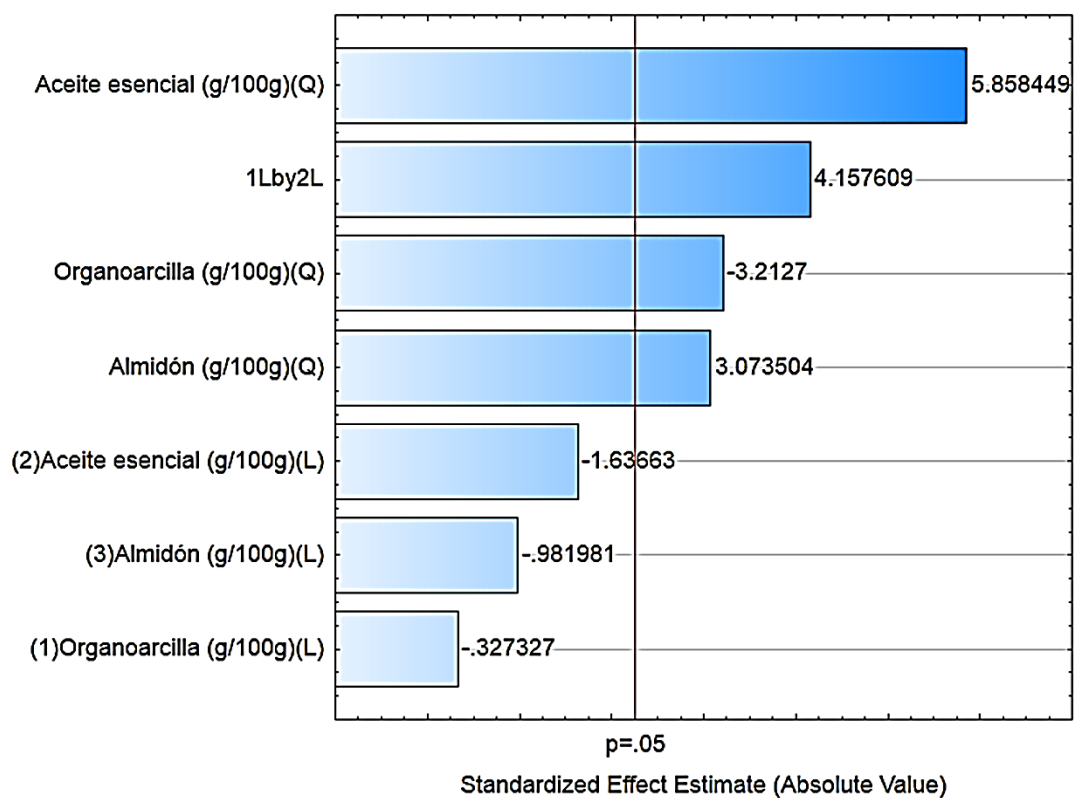
### Anexo 12. Gráfica de Pareto de ISA



**Anexo 13.** Coeficiente de regresión de *enterobacteria* (UFC/g)

Factor	Regress.			P	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
	Coef.	Std.Err.	t(9)			
Media/Intersección	-51,422	18,19732	-2,82581	0,019854	-92,587	-10,257
(1)Organoarcilla (g/100g)(L)	-40,806	8,61637	-4,73582	0.001065	-60,297	-21,314
Organoarcilla (g/100g)(Q)	30,694	9,55410	3,21270	0,010613	9,082	52,307
(2)Aceite esencial (g/100g)(L)	54,167	17,23273	3,14324	0,011866	15,184	93,150
Aceite esencial (g/100g)(Q)	-223,889	38,21641	-5,85845	0,000241	-310,340	-137,437
(3)Almidón (g/100g)(L)	19,717	6,48929	3,03834	0,014056	5,037	34,396
Almidón (g/100g)(Q)	-1,661	0,54046	-3,07350	0,013279	-2,884	-0,439
1L por 2L	79,444	19,10820	4,15761	0,002456	36,219	122.670

**Anexo 14.** Gráfica de Pareto de actividad antimicrobiana (*enterobacterias* (UFC/g))



**Anexo 15.** Coeficiente de regresión de actividad antimicrobiana (*s. aureus* (UFC(g)))

Factor	R. Coef.	Std.Err.	t(9)	P	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Media/Intersección	6,1967	5,62984	1,1007	0,299601	-6,5389	18,9322
(1)Organoarcilla (g/100g)(L)	-31,0556	2,66571	-11,6500	0,000001	-37,0858	-25,0253
Organoarcilla (g/100g)(Q)	21,6667	2,95582	7,3302	0,000044	14,9801	28,3532
(2)Aceite esencial (g/100g)(L)	-14,1556	5,33142	-2,6551	0,026255	-26,2161	-2,0951
Aceite esencial (g/100g)(Q)	-39,000	11,82329	-3,2986	0,009251	-65,7461	-12,2539
(3)Almidón (g/100g)(L)	1,3650	2,00764	0,6799	0,513672	-3,1766	5,9066
Almidón (g/100g)(Q)	-0,1300	0,16721	-0,7775	0,456824	-0,5082	0,2482
1L por 2L	57,4167	5,91164	9,7125	0,000005	44,0436	70,7897

**Anexo 16.** Gráfica de Pareto de actividad antimicrobiana (*s. aureus* (UFC/g))

