



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

Elaboración y caracterización de biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz - papa, sorbitol y aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

TESIS

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

AUTOR

Alexandra Janeth LEON MONCADA

ASESOR

Mg. Sc. Noemí BRAVO ARANÍBAR

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Leon, A. (2021). *Elaboración y caracterización de biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz - papa, sorbitol y aceite esencial de orégano (Origanum vulgare)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Alexandra Janeth Leon Moncada
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76530357
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9921-5690
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Noemí Bravo Aranibar
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10672520
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3454-2601
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Jorge Ernesto Guevara Vásquez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	27417434
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Miguel Edgardo Vera Vásquez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07320820
Datos de investigación	
Línea de investigación	C.0.4.4. Tecnología de los Alimentos
Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento

Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2020
URL de disciplinas OCDE	Alimentos y bebidas. https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.00 Ingeniería de producción. https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.00



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1202, 1203, 1205, 1206, 1207 Telefax: 1209, 1218
Ciudad Universitaria – Av. Venezuela s/n – Lima 1

“Año del Bicentenario del Perú: 200 años de independencia”

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

A C T A DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL

Los suscritos Miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, bajo la Presidencia del Ph.D. **JORGE ERNESTO GUEVARA VÁSQUEZ** el Ing. **MIGUEL EDGARDO VERA VÁSQUEZ** (Miembro) y la Mg. **NOEMI BRAVO ARANIBAR** (Asesora), habiendo presentado para el efecto la **TESIS**, titulada “**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE UNA MEZCLA DE ALMIDÓN DE MAÍZ - PAPA, SORBITOL Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)**”, después de **SUSTENTADA Y APROBADA LA TESIS** elaborada por la Bachiller en Ingeniería Agroindustrial: **LEÓN MONCADA ALEXANDRA JANETH**; para optar el **TITULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL**, acordando calificarla con la **NOTA** de:

DIECISIETE

.....
(LETRAS)

17

.....
(NÚMEROS)

Lima, 03 de marzo del 2021



Firmado digitalmente por GUEVARA
VASQUEZ Jorge Ernesto FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.03.2021 13:35:39 -05:00

Ph.D. JORGE ERNESTO GUEVARA VÁSQUEZ
Presidente


Ing. MIGUEL EDGARDO VERA VÁSQUEZ
Miembro


Mg. NOEMI BRAVO ARANIBAR
Asesora



Firmado digitalmente por NAGLES
VIDAL Edgar Orlando FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 09.03.2021 11:31:47 -05:00

Dr. EDGAR ORLANDO NAGLES VIDAL
Director de la EP de Ingeniería Agroindustrial

DEDICATORIA

*A Dios, por darme vida, fortaleza y siempre
acompañarme en cada paso que doy.*

*A mi mamá Blanca Flor, por ser mi guía a lo largo de
toda mi vida, por ser mi refugio, por todo su amor y sus
grandes acciones, y por ser mi motivo para superarme.*

*A mi papá Salvador, por enseñarme a luchar, a
conseguir lo que me propongo con mis propios méritos,
por ser mi ejemplo a seguir con su perseverancia y
trabajo, y por motivarme día a día con sus palabras.*

*A mi abuelita María, a mis hermanas Ivana y Sofía y a
toda mi familia Moncada, por el gran y magnífico
hecho de ser mi familia.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por darme vida para realizar la presente investigación.

A la Mg. Sc. Noemí Bravo, asesora de la presente investigación, por todo el tiempo y la paciencia brindados, por sus grandes enseñanzas en todo aspecto, por ser una gran asesora y por ser mi apoyo incondicional a lo largo de toda esta investigación.

Agradezco enormemente al ITP (Instituto Tecnológico de la Producción), por la gran oportunidad de ejecutar parte de la tesis en los laboratorios de Físicoquímica y Microbiología. De igual forma agradecer enormemente el apoyo y orientación brindado por los profesionales del instituto, especialmente al Ingeniero pesquero Aarón Romero, Magister Silvia Pandía, Doctor Miguel Aleman, Bióloga Roxana Cespedes, Tco. Luis Quispe, Ingeniera Kathy Diaz, Ingeniero Eduardo y al Sr. Sabino Moreno.

Al laboratorio de investigación de la Escuela Profesional de Química de la UNMSM, en especial al Dr. Julio César Santiago y a la química Marlene Velásquez.

Al laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNMSM, especialmente al Dr. Jorge Guevara, Ing. Miguel Vera, Ing. Oscar Santisteban, Ing. Oscar Crisóstomo, Tco. Tito y en su momento al Ing. Reynaldo Silva de la Universidad Nacional de la Unión.

A mi querido amigo e ingeniero agroindustrial,
Alex Sander Cárdenas.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	3
2. FUNDAMENTO TEORICO	7
2.1. BIOPOLIMEROS	7
2.1.1. Generalidades.....	7
2.1.1 Aplicaciones de biopolímeros	8
2.2 ALMIDÓN	9
2.2.1 Generalidades.....	9
2.2.2 Estructura química.....	12
2.2.3 Extracción de almidón nativo.....	15
2.2.4 Propiedades funcionales del almidón	16
2.2.4.1 Gelatinización de almidón	16
2.2.4.2 Retrogradación de almidón	19
2.3. PLASTIFICANTES	20
2.3.1. Generalidades.....	20
2.3.2. Sorbitol.....	21
2.3.3. Aplicaciones	23
2.3.4. Evaluación del efecto plastificante	24
2.4. ACEITE ESENCIAL	24
2.4.1. Generalidades.....	24
2.4.2. Extracción y aislamiento.....	25
2.4.3. Usos y aplicaciones.....	27
2.4.4. Aceite esencial de orégano.....	28
2.4.5. Actividad antimicrobiana.....	30
2.5. BIOPELICULAS	31
2.5.1. Generalidades.....	31
2.5.2. Elaboración de biopelículas	31
2.5.3. Propiedades mecánicas y físicas	33
2.5.3.1. Resistencia a la Tracción y Elongación	33
2.5.3.2. Transparencia.....	33
2.5.3.3. Permeabilidad al Vapor de Agua	34
2.5.4. Aplicaciones de biopelículas	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	36
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS	36

3.2.1. Materia prima.....	36
3.2.2. Aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	36
3.2.3. Insumos	37
3.2.4. Inóculo y medios de cultivo	37
3.2.5. Material de laboratorio	38
3.2.6. Instrumentos y equipos.....	39
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	39
3.3.1. Análisis efectuados en el proceso de elaboración de biopelículas	39
3.3.1.1. Resistencia a la Tracción	40
3.3.1.2. Elongación.....	41
3.3.2. Análisis efectuados al aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	41
3.3.2.1. Actividad Antimicrobiana.....	41
3.3.3. Caracterización de la biopelícula en el tratamiento seleccionado y con aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	42
3.3.3.1. Propiedades Mecánicas de la biopelícula	42
3.3.3.2. Propiedades Físicas.....	42
3.3.3.3. Propiedades Antimicrobianas.....	42
3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	43
3.4.1. Obtención de biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz-papa, sorbitol y aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	43
3.4.2. Descripción del Proceso	44
3.4.2.1. Elaboración de la solución de biopelícula del diseño factorial multinivel.....	44
3.4.2.2. Secado.....	45
3.4.2.3. Almacenamiento.....	45
3.4.2.4. Caracterización.....	45
3.4.2.5. Preparación de la solución con la mejor formulación de biopelícula y con aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	46
3.4.2.6. Secado.....	46
3.4.2.7. Almacenamiento.....	46
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	47
3.5.1. Biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz-papa y sorbitol.....	47
3.5.2. Biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz-papa, sorbitol y aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	49
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
4.1. EVALUACIÓN DE LA MEJOR FORMULACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS A BASE DE ALMIDÓN DE MAÍZ-PAPA	50

4.1.1. Efecto de las variables de concentración de sorbitol, temperatura de proceso y proporción de almidón de maíz-papa	50
4.1.2. Elección de la mejor formulación en base a las propiedades mecánicas.....	56
4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL AEO-ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (<i>Origanum vulgare</i>).....	59
4.3. ELABORACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE UNA MEZCLA DE ALMIDÓN DE MAÍZ, DE PAPA, SORBITOL Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (<i>Origanum vulgare</i>).....	61
4.3.1. Efectos de la variable Concentración de aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	62
4.3.2. Determinación de la concentración (%).....	66
4.4. CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE UNA MEZCLA DE ALMIDÓN DE MAÍZ-PAPA, SORBITOL Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (<i>Origanum vulgare</i>).....	66
4.4.1. Propiedades Mecánicas	68
4.4.2. Propiedades Físicas	70
4.4.3. Propiedades Antimicrobianas.....	71
5. CONCLUSIONES	72
6. RECOMENDACIONES	73
LISTA DE REFERENCIAS	74
ANEXOS	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los polímeros biodegradables dividido en 2 tipos de recursos.....	7
Figura 2. Gránulos de diferentes almidones visto por microscopía de barrido electrónico: a) maíz normal, b) maíz ceroso, c) papa y d) trigo.....	11
Figura 3. Gránulos de almidón de papa, con largo de 53 um y ancho de 33 um	11
Figura 4. Representación de una sección colateral de un gránulo de almidón	12
Figura 5. Estructura de la cadena de amilosa.	13
Figura 6. (a) Enrollamiento helicoidal de la amilosa. (b) Estructura química de la amilopectina.....	13
Figura 7. Esquema de la organización de un gránulo de almidón.	14
Figura 8. Obtención del almidón.....	15
Figura 9. Modificaciones químicas y bioquímicas del almidón.	16
Figura 10. Proceso de gelatinización del almidón; hinchazón de gránulos y retención máxima de agua produciendo la ruptura y dispersión molecular de los 2 componentes del almidón.....	18

Figura 11. Viscosidad de varios almidones a pH 5.0 (6.0% sólidos): a) maíz; b) papa, y maíz céreo.....	18
Figura 12. Mecanismos de retrogradación del almidón.	20
Figura 13. Estructura del Sorbitol.....	22
Figura 14. Localización de los aceites esenciales.....	25
Figura 15. Estructura química de los principales componentes del orégano.	29
Figura 16. Flujograma de elaboración de biopelículas y con aceite esencial de orégano.....	44
Figura 17. Efectos principales para la resistencia a la tracción.....	53
Figura 18. Almidón plastificado.....	55
Figura 19. Efectos principales para la elongación.....	55
Figura 20. Interacciones significativas para la resistencia a la tracción.....	56
Figura 21. Pruebas de Múltiple Rangos para Resistencia a la tracción por Tratamiento.....	58
Figura 22. Pruebas de Múltiple Rangos para Elongación por Tratamiento.....	58

Figura 23. Actividad antimicrobiana del AEO frente a (a) <i>Escherichia coli</i> , (b) <i>Staphylococcus aureus</i> , (c) <i>Proteus vulgaris</i> , (d) <i>Bacillus cereus</i> y (e) <i>Salmonella spp</i>	60
Figura 24. Biopelícula al 2.5% de AEO.....	65
Figura 25. Comparación de la resistencia a la tracción de biopelículas Control (0% AEO) y biopelículas al 1% AEO.....	69
Figura 26. Comparación de la elongación de biopelículas Control (0% AEO) y biopelículas al 1% AEO.	70
Figura 27. Comparación del espesor de biopelículas Control (0% AEO) y biopelículas al 1% AEO.	71
Figura 28. Comparación de la actividad antimicrobiana de biopelículas al 1% AEO.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables independientes con sus respectivos niveles.....	48
Tabla 2. Diseño factorial multinivel 2x2x3 utilizado en la elaboración de biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz - papa y sorbitol.....	48
Tabla 3. Diseño utilizado para las biopelículas con AEO.....	50
Tabla 4. Valores experimentales de resistencia a la tracción en cada tratamiento.....	51
Tabla 5. Análisis de Varianza para Resistencia a la tracción por tratamiento.....	57
Tabla 6. Análisis de Varianza para Elongación por tratamiento.....	57
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de AEO - aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	59
Tabla 8. Actividad antimicrobiana de la biopelícula con aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	62
Tabla 9. Tabla ANOVA para Inhibición de <i>Bacillus cereus</i> por Concentración de AEO.....	63
Tabla 10. Tabla ANOVA para Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por Concentración de AEO.....	63

Tabla 11. Caracterización de la biopelícula con formulación seleccionada: 60% sorbitol, 95°C temperatura de proceso, 50% Almidón de maíz: 50% Almidón de papa y 1% AEO.....	66
Tabla 12. Caracterización de la biopelícula control con formulación seleccionada: 60% sorbitol, 95°C temperatura de proceso, 50% Almidón de maíz: 50% Almidón de papa y s/ AEO.....	72
Tabla 13. Propiedades mecánicas de algunos plásticos utilizados en la industria alimentaria...	72

ANEXOS

Anexo 1. Modelo de Informe de resultados emitido por el texturómetro.....	88
Anexo 2. Flujo de operaciones para la elaboración de biopelículas a base de mezcla de almidón de maíz - papa y sorbitol	89
Anexo 3. Flujo de operaciones para la elaboración de biopelículas a base de mezcla de almidón de maíz - papa, sorbitol y AEO.....	90
Anexo 4. Imágenes de biopelículas del diseño factorial multinivel.....	91
Anexo 5. Análisis de Varianza para Resistencia a la Tracción.....	92
Anexo 6. Análisis de Varianza para Elongación.....	92
Anexo 7. Biopelículas con la mejor formulación, control y al 1% de AEO.....	92

RESUMEN

El desarrollo de la tesis se enfocó en tres etapas: la primera etapa involucró la evaluación de la mejor formulación de la biopelícula a partir de la mezcla de almidón de maíz-papa y sorbitol en función de las propiedades mecánicas; la segunda etapa, consistió en la determinación de la concentración (%) de aceite esencial de orégano (AEO) que se requiere adicionar a la formulación de la biopelícula mediante evaluación de actividad antimicrobiana y finalmente, la caracterización de la biopelícula.

Inicialmente, se elaboraron las biopelículas mediante el método de casting utilizando un diseño factorial multinivel $2 \times 2 \times 3$ con una réplica, siendo los factores: la concentración de plastificante sorbitol (60% y 80%), temperatura de proceso (85°C y 95°C) y proporciones de almidón de papa (P) y almidón de maíz (M): 0%M:100%P, 25%M:75%P y 50%M:50%P, se realizó la evaluación de estos factores para la determinación de la mejor formulación en base a sus propiedades mecánicas: Resistencia a la tracción (RT) (MPa) y Elongación (E) (%). Los resultados se aceptaron con un nivel de 95% de confianza ($p < 0.05$) y mediante comparación de medias LSD. El tratamiento seleccionado fue conformado por sorbitol al 60%, temperatura de proceso al 95°C y la proporción de mezcla al 50%P:50%M (almidón de maíz: almidón de papa), dicho tratamiento obtuvo 6.23 de RT (MPa) y 14.67 de E (%).

La formulación seleccionada en la primera etapa se emplea como base polimérica para la segunda etapa, donde se adicionó el AEO a 0, 1 y 2.5 % a la matriz polimérica, utilizando un diseño factor categórico individual, en el que se determinó la influencia del AEO sobre la actividad antimicrobiana. La concentración seleccionada fue de 1% AEO, con un nivel de 95 % de confianza ($p < 0.05$). En la caracterización de la biopelícula con la mejor formulación y 1 % AEO, se obtiene

un 4.03 de RT (MPa), 30.21 de E (%), espesor de 0.07 mm y actividad antimicrobiana con mayor inhibición de *Staphylococcus aureus*, seguido de *Bacillus cereus*. Todos los resultados fueron evaluados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y aceptados con un nivel de 95 % de confianza ($p < 0.05$).

Palabras clave: Biopelículas, Almidón, Sorbitol, Aceite Esencial, Propiedades Mecánicas, Propiedad Antimicrobiana.

1. INTRODUCCION

A nivel mundial, la producción de plásticos en el 2017 alcanzó los 348 millones de toneladas, volumen superior en 3.8% respecto a lo registrado en el 2016. Conforme a los datos publicados por la Sociedad Nacional de Industrias (SIN), en un reporte sectorial del 2019, Perú ha aumentado en 4.5% la producción de plásticos, siendo únicamente superado por Colombia en un 0.3%, en base a los países que conforman la Alianza del Pacífico. Estos números resultan ser alarmantes y caso contrario poco ideal para una protección idónea del medio ambiente (SNI, 2019).

En el Perú, se utiliza al año aproximadamente 30 kg de plástico por ciudadano, en promedio; siendo durante el año cerca de 3 mil millones de bolsas plásticas. A nivel de Lima Metropolitana y el Callao se generan 886 toneladas de residuos plásticos al día, representando el 46% de dichos residuos a nivel nacional (MINAM, s.f.). Siendo una característica propia de estos materiales: “la durabilidad, puede demorar como mínimo 200 años en degradarse; en base a este punto, resulta preocupante que la mayor producción (36 %) provenga del sector embalaje, considerado como plástico de un solo uso” (Muñoz, 2018). Por otra parte, dentro de los plásticos de un solo uso, encontramos a las botellas de plástico, popotes, recipientes, cubiertos, platos, materiales de poliestireno y bolsas; este último elemento representa una ratio aproximado de 6 mil bolsas por cada minuto (MINAM, s.f.). Debido a esta problemática, una de las herramientas es concentrar mayor inversión en innovación para la generación de productos de plásticos que sean más sostenibles, en tal sentido, se contempla como estrategia, el uso de bioplásticos como biopelículas generalmente desarrolladas con carbohidratos, proteínas, grasas y otros biopolímeros, representando una de las alternativas más prometedoras en comparación a los polímeros sintéticos como materiales de embalaje, contribuyendo así al impulso para reducir el consumo de este tipo de plásticos (Dai, Chang, Geng, Yu y Ma, 2010).

Así mismo, la producción de bioplásticos inteligentes ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica, ya que, estos materiales informan a los consumidores sobre el estado de los alimentos perecederos, así como advertirles sobre la presencia de contaminantes, y/o alimentos adulterados. Esta sería una forma de reducir la gran cantidad de alimentos que los consumidores descartan y que podrían alimentar a todos las personas que actualmente padecen hambre en el mundo (FAO, 2014).

Dentro de las alternativas para la producción de bioplásticos, encontramos el uso de almidón como material base para el desarrollo de productos comestibles y la producción de las películas ha sido estudiada debido a su amplia disponibilidad, bajo costo, no toxicidad, renovabilidad, biodegradabilidad y capacidad para ser procesadas por equipos actualmente disponibles en las industrias de polímeros y alimentos (Veiga-Santos, Oliveira, Cereda, y Scamparini, 2007).

Sin embargo, mayormente las películas basadas en almidón poseen dos inconvenientes principales: la hidrofilia y la fragilidad que aún deben superarse, antes de ser aplicadas ampliamente como materiales de envasado de alimentos (Iman y Maji, 2012). Por tal motivo, se proponen alternativas para mejorar las propiedades de las películas de almidón como, por ejemplo: la modificación del almidón nativo, el uso de diferentes plastificantes, mezcla de almidón con otros polímeros naturales o sintéticos, el uso de aditivos alimentarios y la adición de nanorellenos naturales o modificados (Gutiérrez, González, Medina, Famá y Goyanes, 2017).

Tal como se menciona, la formulación de biopolímeros con almidón, plastificantes y aceites esenciales ha continuado el desarrollo de investigaciones con el fin de mejorar las propiedades de las biopelículas de almidón. Estas mezclas, según las características de sus constituyentes, pueden ofrecer cualidades en sus propiedades físicas: Permeabilidad al Vapor de

Agua, propiedades mecánicas y de transparencia (Acosta, 2014). Sin embargo, para ser comercializados, materiales potenciales en costo y atributos, son necesarios más estudios enfocados en la producción de envases y embalajes alimentarios-biodegradables y seguros, eliminando actuales vallas que limitan su uso y aplicación.

La justificación del presente estudio radica en la sustitución de plásticos derivados de petróleo implicando el desarrollo de distintos métodos de conservación, entre ellos, una opción distinta a lo convencional viene dada por el desarrollo de biopelículas o films comestibles que son utilizadas comúnmente como barreras selectivas para la transferencia de gases, humedad y nutrientes. Así mismo, la mayoría de los envases son elaborados con materiales plásticos, surgiendo la preocupación de sustituir lo sintético por empaques biodegradables, otorgando características propias al alimento y dando la posibilidad de ser ingeridas, sin preocupación. La formulación de cada biopelícula depende de la aplicación que se requiere para determinado alimento, en este estudio se utiliza almidón de maíz y de papa, debido a que son considerados los polisacáridos más comerciales, comúnmente encontrados en diferentes fuentes vegetales y también por sus óptimas propiedades para formar biopelículas; el uso de sorbitol como plastificante natural modifica las propiedades mecánicas produciendo películas de almidón con mayor flexibilidad y menos quebradizas. La actividad antimicrobiana ofrecida por la biopelícula está dada por el aceite esencial de orégano ayudando a inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphilococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

En base a que las características de los bioplásticos juegan un papel muy importante cuando son considerados como alternativas de envase o embalaje, nos planteamos los objetivos siguientes:

a) Objetivo general:

- Realizar la elaboración y caracterización de biopelículas en base a una mezcla de almidón de maíz-papa, sorbitol y aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*).

b) Objetivos específicos:

- Evaluar la mejor formulación de la mezcla de almidón de maíz-papa y sorbitol para la elaboración de biopelículas en función de las propiedades mecánicas.
- Determinar la concentración de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) para su adición en la formulación de la biopelícula mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana.
- Caracterizar las biopelículas midiendo propiedades mecánicas.

2. FUNDAMENTO TEORICO

2.1. BIOPOLIMEROS

2.1.1. Generalidades

Los biopolímeros son sustituyentes del plástico, reducen la problemática ambiental y la dependencia del petróleo. Siendo considerados como materia prima para ser alternativas de envasado, los polímeros biodegradables permiten a los envases ser compostables completamente (Zhong, Godwin, Jin y Xiao, 2020). Así mismo, los biopolímeros son extraídos de fuentes de origen vegetal como: almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina y de fuente animal como: colágeno, queratina, quitina y otros polímeros bacterianos. La elección del biopolímero a utilizar puede radicar en cuanto a su costo o disponibilidad en la naturaleza. La clasificación de los biopolímeros (figura 1) está agrupada en diferentes tipos según su síntesis, fuentes y proceso.

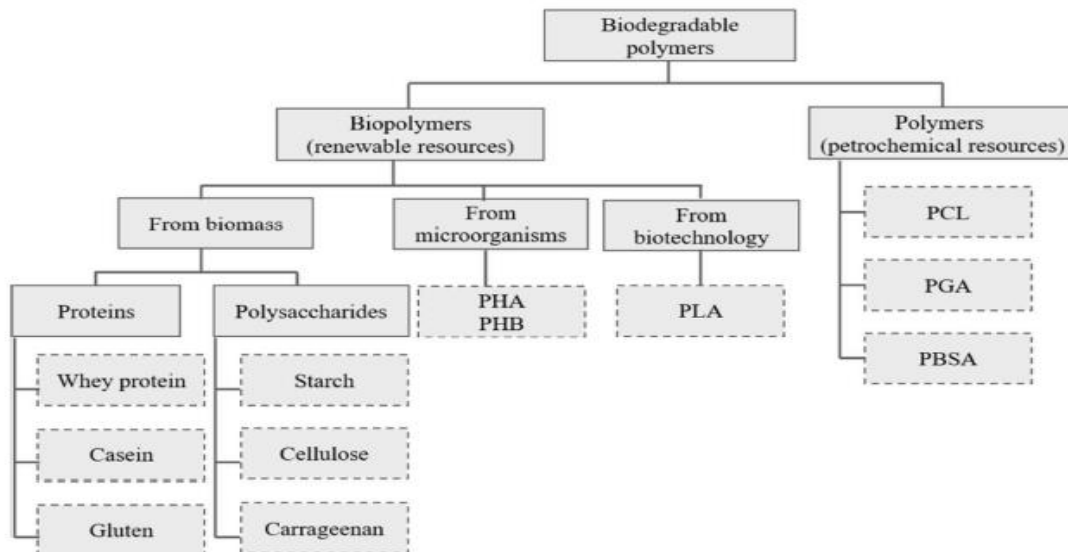


Figura 1. Clasificación de los polímeros biodegradables dividido en 2 tipos de recursos.

Fuente: Zhong *et al.*, 2020.

Entre los biopolímeros más prometedores para el envasado de alimentos se tienen al almidón de diferentes fuentes botánicas (maíz, yuca, trigo y otros). Los cultivos de almidón

están disponibles en todo el mundo y tienen un bajo costo de comercialización (Xie, Halley y Avérous, 2012). El maíz es la fuente de almidón más importante en los Estados Unidos (99%), Europa (46%), Asia y Brasil. Estados Unidos, China y Brasil fueron los mayores productores de maíz en 2009 y produjo 333, 163 y 51 millones de toneladas, respectivamente. Por otro lado, el segundo cultivo con mayor importancia a nivel nacional es la papa, ocupando un lugar muy importante en la economía agrícola (MINAGRI, 2019). Por lo tanto, el interés en estos cultivos de almidón para la producción de biopelículas alimentarias es justificado.

2.1.1 Aplicaciones de biopolímeros

La aplicación de los polímeros biodegradables presentes en la naturaleza puede diferir según la fuente de origen siendo convencionalmente consumido como alimento o utilizado como insumos o aditivos en la preparación de alimentos, así como en las siguientes aplicaciones industriales:

Utilizado comúnmente como componente para ligantes de papel, insumos adhesivos, materia prima para fermentación, textiles, producción química, recubrimientos y películas o films activos y comestibles, así como en la fabricación de otros productos industriales (Ojogbo, Ogunsona y Mekonnen, 2019). El bajo costo de los polímeros biodegradables, la gran abundancia, la facilidad de crecimiento u obtención, así como sus características, propiedades fisicoquímicas y funcionales han despertado el interés en la obtención y desarrollo de biopelículas para diferentes aplicaciones de grado alimentario.

La aplicación de recubrimientos implica formar una capa directamente sobre la superficie de productos alimenticios, mientras que las películas son estructuras que se aplican después de formarse por separado. Las aplicaciones de películas como materiales de embalaje son bolsas, sobres, transparencias, contenedores de alimentos, tapas, etc (Gross y Kalra, 2002).

Los materiales a base de biopolímeros deben satisfacer los requisitos básicos de seguridad sanitaria, resistencia mecánica o química y durabilidad. Por esta razón, los productores de envases prestan atención, no solo a la biodegradabilidad, sino también a la funcionalidad de los biopolímeros, ya que pueden ser competitivos con los polímeros convencionales (Tharanathan, 2003). En comparación con los polímeros sintéticos convencionales derivados del petróleo, los biopolímeros tienen una estructura química más compleja, dando a los materiales mayores oportunidades para la formación de materiales de embalaje con características específicas para un propósito particular (Weber, 2000).

2.2 ALMIDÓN

2.2.1 Generalidades

Es el polisacárido principal en la dieta del hombre y fuente de reserva energética en el almacenamiento de las plantas. Además de haberle atribuido un gran número de utilidades a nivel industrial. Seguido de la celulosa, es el carbohidrato más importante comercialmente y presente en mayor cantidad. El almidón es un polisacárido natural biodegradable, económico y disponible abundantemente. Se genera a partir de dióxido de carbono y agua por fotosíntesis en las plantas (Teramoto et al., 2003; Lu, 2009).

A diferencia de otros polímeros de polisacáridos que se cosechan o extraen a partir de la destrucción de plantas, el almidón se puede obtener en la mayoría de los casos sin destruir la planta. Como fuentes de extracción se encuentran los tubérculos, los cereales, semillas, raíces, y frutos como fuentes de carbohidratos. El porcentaje de concentración de este polisacárido depende de la etapa de maduración de diversas fuentes (Badui, 2006) y las propiedades funcionales del almidón también pueden ser diferentes, dependiendo del cultivar y las condiciones de crecimiento.

En comparación de las raíces y tubérculos (que producen raíces almidonadas, rizomas, callos y tallos) con frutas, granos y cereales (trigo, arroz, maíz, avena, cebada, mijo, sorgo y quinua), las primeras muestran un mayor contenido de almidón, debido al bajo contenido de agua. Estos diferentes almidones obtenidos de algunos cereales (maíz y trigo), algunos tubérculos y raíces (particularmente la papa y la yuca) son los principales productos comerciales y en gran medida, los que dominan la producción de almidón (Luc, 2015).

El almidón dentro de la planta se almacena en forma granular (figura 2), se considera como gránulo de almidón al pequeño corpúsculo discreto que no ha sido procesado y/o no modificado (Sundays de Sousa, Hollans – Araujo y Rodriguez de Souza, 2017), los gránulos de almidón producen una presión osmótica muy débil, con ello se almacenan enormes porcentajes de glucosa de forma altamente accesible sin modificar internamente el balance de agua en la planta. Cada especie botánica tiene características propias con respecto a la forma y tamaño del gránulo; dichas características han sido aprovechadas en la aplicación de diferentes métodos microscópicos para la identificación de la procedencia de los distintos almidones. Dentro de un mismo cereal se aprecian varios tipos de gránulos; en general, los ubicados en la posición externa del endospermo son poliédricos, mientras que los del interior son esféricos (Badui, 2006).

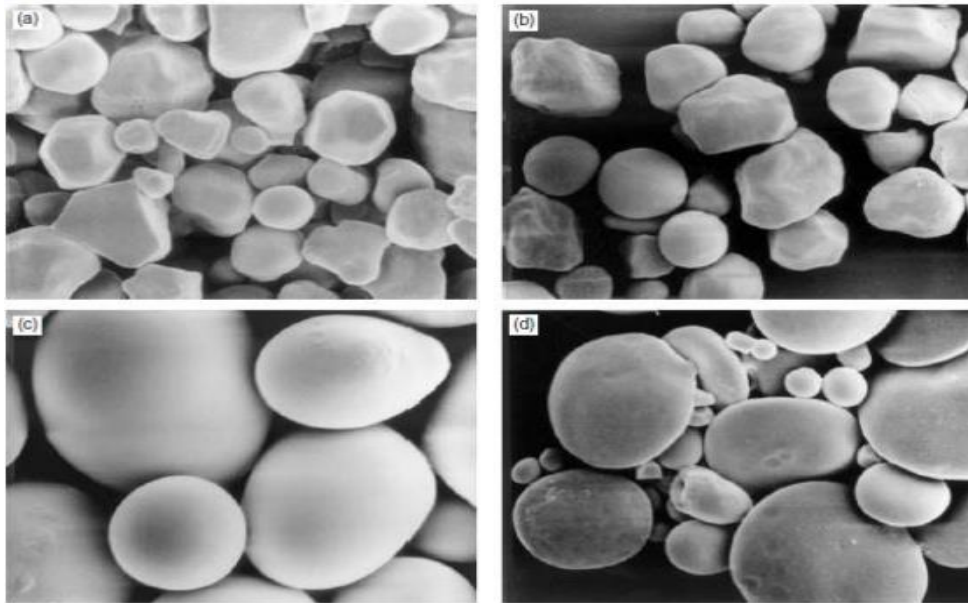


Figura 2. Gránulos de distintos almidones vizualizados por microscopia de barrido electrónico: a) maíz normal, b) maíz ceroso, c) papa y d) trigo. Fuente: Bemiller y Whistler, 2009.

Los gránulos de almidón se pueden aislar por centrifugación, sedimentación, filtración, por gravedad y ser aplicados a distintas modificaciones enzimáticas, físicas y químicas para diversas utilidades alimentarias y no alimentarias. Dependiendo del recurso vegetal, los gránulos de almidón varían en tamaño de aproximadamente 2 a 150 μm (figura 3).

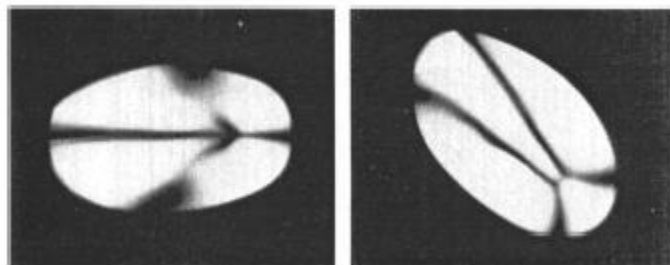


Figura 3. Gránulos de almidón de papa, con largo de: 53 μm y ancho de: 33 μm . Fuente: Whistler, BeMiller y Paschall, 1984.

2.2.2 Estructura química

La estructura compacta de gránulos de almidón está formada por capas concéntricas de: amilopectina y amilosa (figura 4), estas capas no presentan alteración durante la reducción de tamaño, desarrollo del proceso y la obtención de los almidones aptos para comercializar. Para Badui (2006), la amilosa (figura 5) es el resultado de la condensación de D-glucopiranosas mediante enlaces glucosídicos α (1,4), estableciéndose largas cadenas lineales con 200-2 500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una α -D-(1,4)-glucana, siendo la α -maltosa, su unidad repetitiva.

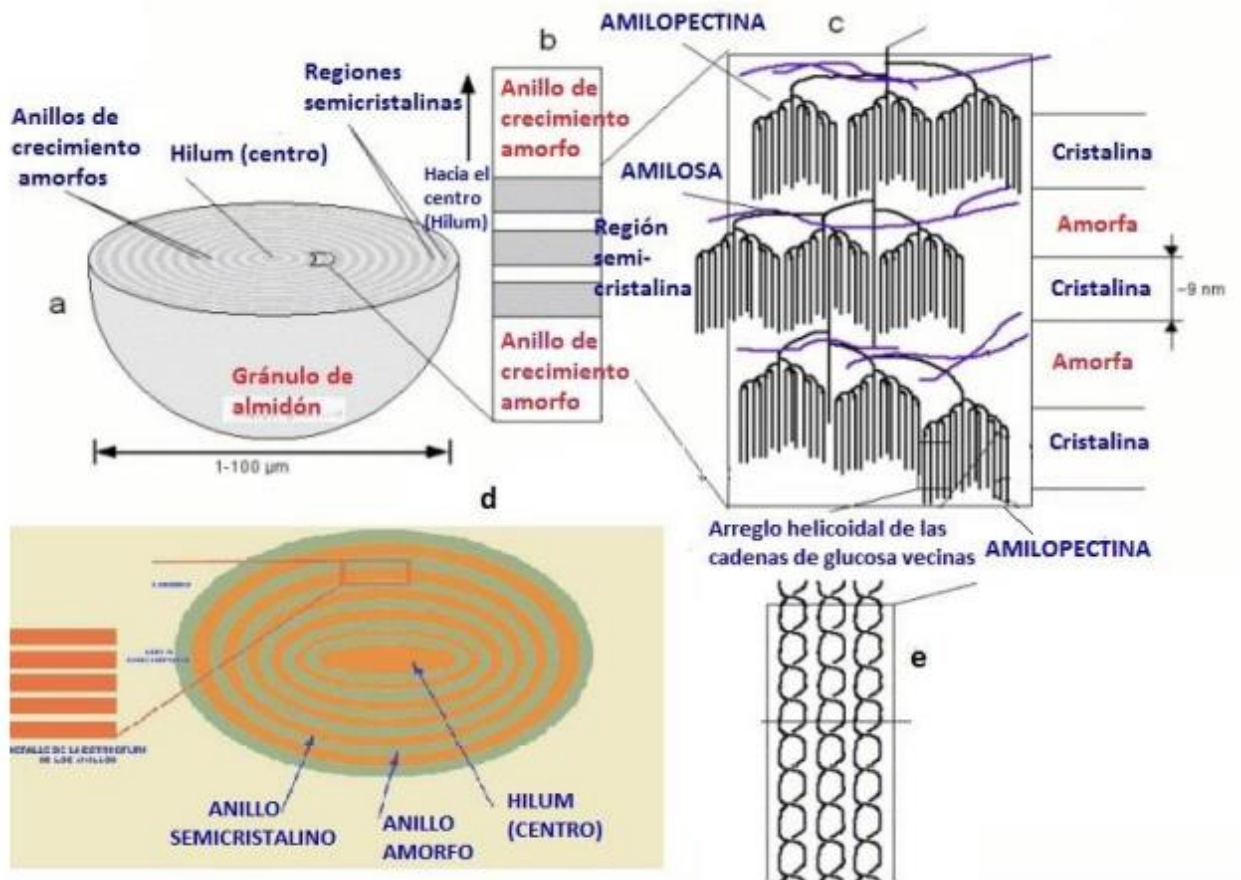


Figura 4. Representación de una sección colateral de un gránulo de almidón. Fuente: Amador, 2018.

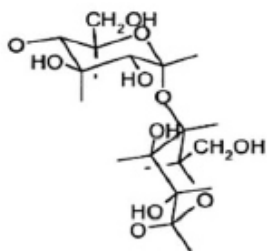


Figura 5. Estructura de la cadena de amilosa. Fuente: Leiva y Obando, 2014.

La amilosa posee en cada vuelta de su hélice 6 moléculas de glucosa. Posee la cualidad de adoptar una conformación tipo tri-dimensional en forma de hélice (ver figura 6a). Por su parte, la amilopectina presenta diferencias con respecto a la amilosa, debido a que posee ramificaciones que le dan una estructura molecular parecida a un árbol; estas ramas están enlazadas al tronco principal ubicado en el centro (semejante a la amilosa por enlaces $\alpha - D - (1,6)$, ubicadas cada 15 hasta 25 unidades lineales de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) (ver figura 6b).

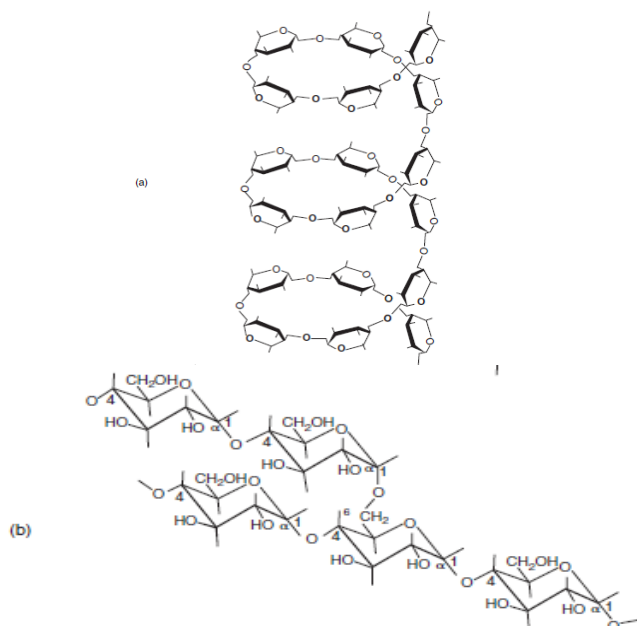


Figura 6. (a) Enrollamiento helicoidal de la amilosa. (b) Estructura química de la amilopectina. Fuente: Badui, 2006.

Los dos cuerpos son birrefringentes, esto se debería a que dentro del gránulos están regiones cristalinas de moléculas de amilosa ordenadas simultáneamente (figura 7) por medio de puentes de hidrógeno, así como regiones amorfas causadas principalmente por la amilopectina, no asociadas entre ellas o con la amilosa. En base a ello, presenta falta de birrefringencia en los gránulos que tienen una cantidad enorme de amilopectina; esta característica y el espectro de rayos X, desaparecen una vez que los gránulos de almidón presentan gelatinización. (Badui, 2006).

La amilosa y la amilopectina intervienen de forma fundamental en las características tanto sensoriales como reológicas de los diferentes alimentos, primordialmente por medio de su propiedad de hidratación y gelatinización. En determinadas ocasiones, cuando uno de estos porcentajes se excede, existe posibilidad de ocasionar ciertos problemas; así como es el caso del arroz cocido, en la que la calidad se optimiza una vez que se disminuye el contenido de amilosa, puesto que resulta menos pegajoso (Badui, 2006).

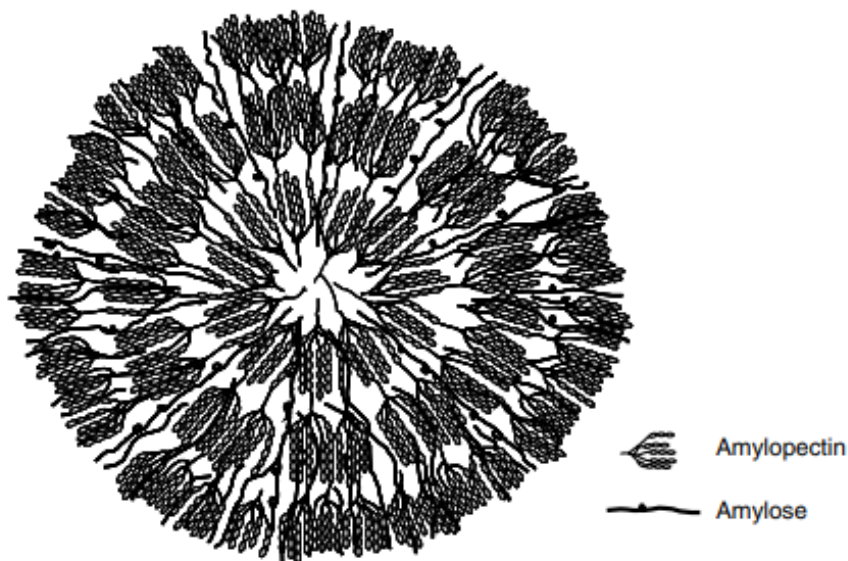


Figura 7. Esquema del ordenamiento de un gránulo de almidón. Fuente: Bemiller y Whistler, 2009.

2.2.3 Extracción de almidón nativo

La obtención del almidón comercial se basa en la molienda del maíz en base húmeda (figura 8), siguiendo uno de los varios procedimientos explicado a detalle: se inicia con la limpieza de los granos y la maceración en agua por 1 a 2 días a 50°C (como agente microbiano se puede agregar una concentración de 0.1 a 0.2 % de anhídrido sulfuroso); durante este proceso el maíz consigue un porcentaje de agua entre 45 - 50%, logrando el ablandamiento y la trituración, durante este periodo el desprendimiento del germen, el cual es recuperado. El resultado de la suspensión pasa por la molienda y el filtrado, mediante diferencia de densidades el almidón se logra separar de las proteínas. Se realiza la purificación del polisacárido para disminuir las proteínas a un costo por debajo de 0.3%. Los sub-productos también poseen un precio comercial, ya que el germen es utilizado para la obtención de aceite comestible, y el gluten, alto en proteínas destinado al consumo humano y para la alimentación de animales de crianza (Badui, 2006).

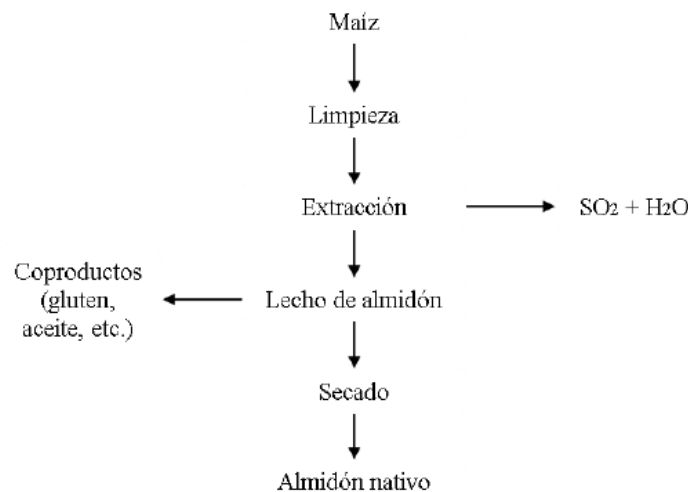


Figura 8. Obtención del almidón. Fuente: Delgado, 2018.

Los almidones originarios, incluyendo los almidones de maíz y almidón de papa, muestran ciertas restricciones para uso industrial. Por consiguiente, son modificados (Figura 9) para mejorar sus características funcionales y tener un extenso rango de aplicaciones industriales. Los productos resultantes o almidones modificados son, consecuentemente, productos de más grande costo añadido.

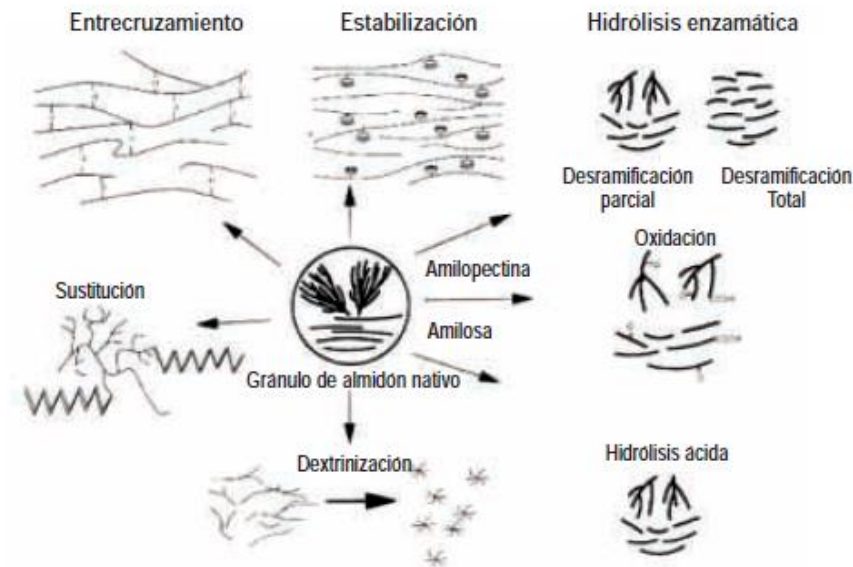


Figura 9. Modificaciones químicas y bioquímicas del almidón. Fuente: FAO, s.f.

2.2.4 Propiedades funcionales del almidón

2.2.4.1 Gelatinización de almidón

En agua fría se muestra insolubilidad de gránulos de almidón, pues su composición está muy estructurada por las diversas relaciones que hay entre los 2 polisacáridos de su composición; no obstante, una vez que aumenta la temperatura, comienza la absorción de agua con lentitud en las regiones intermoleculares amorfas, siendo las más disponibles y con menor organización, debido a que los enlaces de hidrógeno no se presentan en grandes cantidades ni

firmes como en las superficies cristalinas. Mientras aumenta la temperatura, se retiene más agua y el grano empieza a hincharse e incrementa el fenómeno de volumen, observable en el microscopio, sin presentar un aumento determinante de viscosidad; cuando la región amorfa ha absorbido agua enteramente, la región cristalina empieza un proceso similar; requiriendo mayor energía.

Cerca a 65° C, dependiendo de cada almidón, el gránulo alcanza su volumen más alto; conforme se exponga a mayor calor, el gránulo hinchado, queda incapacitado en la retención de líquidos. El gránulo se apretura parcialmente y con ello, la amilosa y la amilopectina altamente hidratadas, se dispersan. En este momento, desaparece la composición original y la birrefringencia del gránulo. Esto anudado a un incremento de viscosidad. En la solución se encuentra aproximadamente 30 % de amilosa. Este proceso se denomina gelatinización, y da paso a un estado de orden (parte cristalina) a otro desordenado donde se absorbe calor. Durante este proceso, los gránulos insolubles evolucionan en una solución constituyente a nivel molecular.

Este fenómeno se observa mejor en la figura 10, se detalla un esquema con el aumento del tamaño de los gránulos en función del incremento de viscosidad en la solución de medio acuoso. Cuando los gránulos se aperturan, disminuye la viscosidad hasta ser estable, creando un gel con propiedades físico-químicas diferentes de acuerdo con el tipo de almidón. Este esquema se explica por una curva obtenida del amilograma mostrado en la figura 11.

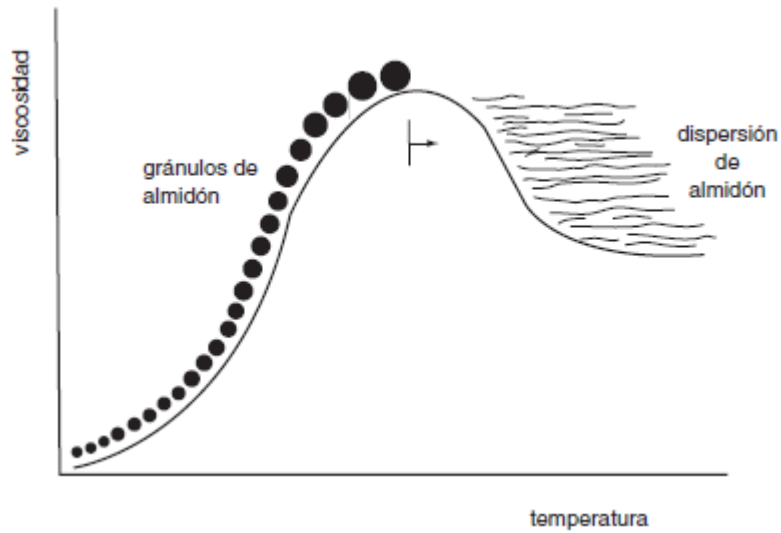


Figura 10. Proceso de gelatinización del almidón; hinchazón de gránulos y retención máxima de agua, produciendo la ruptura y dispersión molecular de los 2 componentes del almidón.

Fuente: Badui (2006).

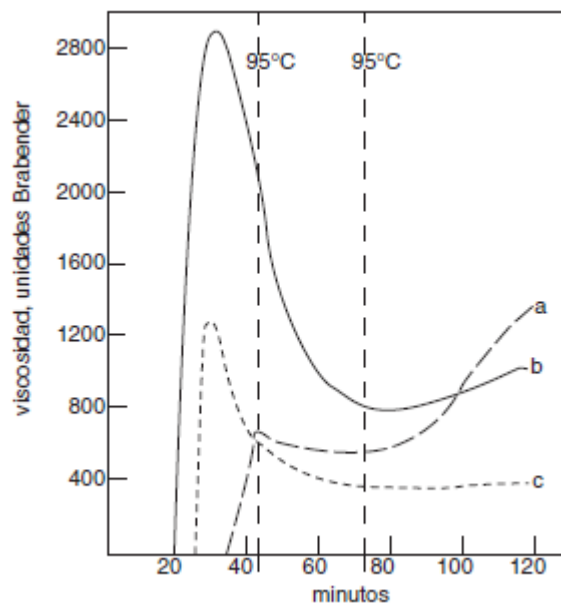


Figura 11. Viscosidad de varios almidones a pH 5.0 (6.0% sólidos): a) maíz; b) papa, y maíz céreo. Fuente: Badui, 2006.

La temperatura de gelatinización es aquella en la que se alcanza el más alto nivel de viscosidad; esta medida es un rango, en la que los gránulos poseen distinta cristalinidad y estructura, a pesar de provenir de una misma fuente vegetal, dando consigo mayor resistencia. A raíz de ello, la temperatura de gelatinización de los primeros gránulos y la de los últimos presenta una diferencia de 8 a 12°C, o en promedio de 10°C. Esta medida también se ve muy influenciada por la existencia de diferentes componentes químicos que ayudan o disminuyen los enlaces de hidrógeno.

2.2.4.2 Retrogradación de almidón

Badui (2006), ha definido este fenómeno como la insolubilización y la rápida precipitación de la amilosa, debido a la orientación paralela de sus cadenas lineales y a la reacción entre sí por enlaces de hidrógeno mediante sus numerosos hidroxilos; según la concentración y la temperatura del sistema, esto se puede hacer por distintos trayectos. Al calentarse y enfriarse rápidamente hasta temperatura ambiente, una solución con alta concentración de amilosa forma un gel rígido y reversible, caso contrario si las soluciones son diluidas, muestran opacidad, precipitan una vez en reposo y enfriándose lentamente (figura 12). La tendencia a la retrogradación depende de cada almidón, esto tiene relación con la concentración de amilosa, a comparación de la amilopectina existe menos probabilidad de desarrollo, debido a que sus ramificaciones no dan paso a la creación de enlaces de hidrógeno entre moléculas adyacentes; sin embargo, si las soluciones de almidón pasan por un congelamiento y descongelamiento, se crea una insolubilización. Las porciones de amilosa o las fracciones lineales de amilopectina que se someten a retrogradación, conforman regiones con una estructura cristalina bastante rígida que necesitan gran cantidad de energía para romperse y dar paso a la gelatinización del almidón. (Badui, 2006).

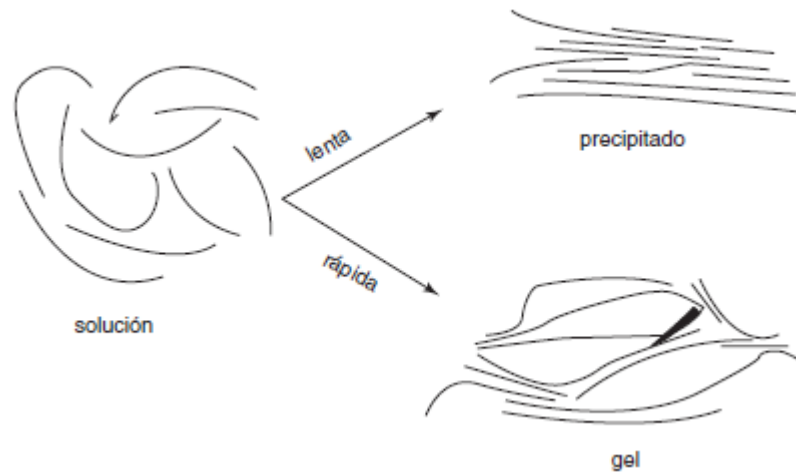


Figura 12. Mecanismos de retrogradación del almidón. Fuente: Badui, 2006.

Según Badui (2006), el tipo y la concentración del hidrocoloide mezclado afectan la retrogradación del almidón. El análisis de las distintas variedades de almidón y las condiciones que influyen la gelatinización y retrogradación, han permitido decidir los componentes que son de provecho para la resistencia a lo largo de la gelatinización o de la retrogradación.

2.3. PLASTIFICANTES

2.3.1. Generalidades

Los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular no volátiles (monosacáridos, oligosacáridos, polioles, lípidos y derivados de estos), son usados en su mayoría en matrices poliméricas. Otra molécula con capacidad plastificante es el agua, por lo que se necesita tener en cuenta su contenido al instante de la construcción de cualquier material polimérico. Para elegir entre los diversos tipos de plastificantes, se necesita tener en cuenta 3 puntos primordiales: la compatibilidad con el polímero; la eficiencia, principalmente un plastificante eficiente entrega una alta plastificación en baja concentración y exhibe instantánea difusión y relación con los polímeros, y la permanencia del plastificante en el material polimérico.

Generalmente, la formación de enlaces de hidrógeno con los bio-polímeros y el aumento del volumen independiente junto a la flexibilidad del material se deben a que gran parte de los plastificantes poseen internamente grupos hidroxilos. El mecanismo por medio del cual se crean dichos cambios podría ser interno y/o externo (Immergut y Mark, 1965). El proceso de plastificación interno modifica químicamente la cadena polimérica por medio de la adición de un conjunto sustituyente unificado por medio de enlace covalente, copolimerizado con el polímero y generando una desorganización de su composición. Esto crea que las cadenas poliméricas queden más separadas, estructurando una matriz menos dura. Por otro lado, el proceso de plastificación externo se genera una vez que un compuesto plastificante se intercala en la red polimérica, interactuando físicamente con ella. No obstante, los plastificantes externos tienen la posibilidad de migrar en el polímero, lo cual puede conducir a la recristalización del material y a la pérdida de elasticidad (Real et al., 2013). Experimentalmente se ha visto que, dependiendo del mecanismo de plastificación que se produce, se generan diferencias en las características mecánicas y la conducta térmica de las biopelículas poliméricas (Videki, Klebert, y Pukanszky, 2007).

Los plastificantes, además de mejorar las características mecánicas de los materiales, tienen la posibilidad de incrementar la permeabilidad a ciertos gases, reduciendo de esta forma su efectividad para la custodia de alimentos, dependiendo de puntos intrínsecos de los plastificantes, como por ejemplo composición química, peso molecular y polaridad.

2.3.2. Sorbitol

El sorbitol es parte del núcleo familiar de los polioles -carbohidratos que tienen dentro diversos conjuntos de OH, sin embargo, no son considerados como azúcares. En cuanto a química, los polioles son considerados alcoholes OH polihidroxílicos, en pocas palabras son

alcoholes de $C_{12}H_{22}O_{11}$, ya que parte de su composición es similar a la sacarosa y la otra semejante al alcohol-OH. Se poseen estructuras químicas de D-manitol, D-Sorbitol y xilitol. En variedad de vegetales y frutas como peras, manzanas, algas marinas y en el tabaco, se pueden encontrar naturalmente presente a los polioles. Los polioles de valor comercial son obtenidos de forma sintética, sin extracción de fuentes de origen natural. (SPI Polyols Inc, 2003)

El sorbitol conocido también como D-Sorbitol o Glucitol, es un alcohol hexahidrolítico que posee cadena lineal de 6 carbonos y 6 conjuntos hidroxilos (figura 13). No tiene participación en las reacciones de Maillard, debido a que posee alta estabilidad y nula reactividad, es decir tiene resistencia a altas temperaturas sin la alteración de color. Tiene características de material cristalino color blanco inodoro en estado sólido. En cuanto a la solubilidad, es insoluble en alcoholes como: metanol CH_3OH y etanol C_2H_5OH , siendo altamente soluble en agua. Así mismo, presenta visual insolubilidad con los solventes orgánicos usuales e inactivo con bases y ácidos.

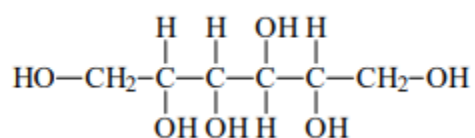


Figura 13. Estructura del Sorbitol. Fuente: Morales, 2007.

Analógicamente, se puede definir como sacarosa refinada de bajas calorías (30% con relación proporcional a la sacarosa); el sorbitol posee poder edulcorante de 60% en comparación con la glucosa y mostrando igual configuración esférica (Calorie control, 2005).

2.3.3. Aplicaciones

El sorbitol tiene un extenso espectro de aplicaciones es usado como precursor de vitamina C. Se utiliza como precursor de la vitamina C, se considera plastificante en gran competencia con la glicerina y es un compuesto humectante, estas son algunas aplicaciones de un amplio espectro de utilidades. Este polirol, como muchos otros es también utilizado en en resinas. A partir del sorbitol, se puede obtener compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica, como es el caso de agentes para clarificar y fluidos para embalsamar (IEC, 2000).

El sorbitol evita la formación de caries dental, su naturaleza química de polirol le otorga resistencia ante el metabolismo de bacterias a nivel oral, al consumirse no se observa liberación de ácidos, los cuales podrían ubicarse en las cavidades de los dientes o erosionar el esmalte dental. En base a lo expuesto anteriormente, el sorbitol es utilizado en la formulación de pastas dentales y gomas de mascar (Calorie control, 2005). Así mismo, también tiene como aplicación en la producción de detergentes biodegradables.

A nivel de la industria alimentaria, este polirol se aplica como espesante en mermeladas y jaleas, conservante en caramelos y preservante ante la rancidez de galletas. En alimentos modificados por agentes surfactantes, el sorbitol tiene mejor y específica afinidad química con los ácidos grasos. En el caso del papel, se utiliza como plastificante en los moldes de inyección aumentando la flexibilidad del material y la suavidad de las fibras, de igual forma se utiliza como agente estabilizador y antioxidante en polímeros sintéticos (Calorie control, 2005).

2.3.4. Evaluación del efecto plastificante

El efecto de la adición de plastificantes se refleja en la conducta física de una película que se puede comer. Es viable hacer una completa evaluación del impacto de los plastificantes en las biopelículas por medio de la caracterización de su morfología y de sus características físicas, y la identificación de los cambios en las interrelaciones químicas entre los polímeros y los plastificantes (Sothornvit y Krochta, 2001).

2.4.ACEITE ESENCIAL

2.4.1. Generalidades

Son compuestos químicos naturales, de naturaleza líquida con alta volatilidad, estructura compleja con grato aroma, proviene de fuentes vegetales con olores específicos, se extrae mediante distintos métodos, siendo uno de los principales, la destilación. De igual forma son descritos como mezclas de distintos elementos volátiles, producidos a partir del metabolismo secundario de las plantas, los aceites esenciales están conformados en gran parte por hidrocarburos de cadena polimetilénica del grupo de terpenos pertenecientes a la fórmula química $(C_6H_8)_n$, en conjunto con algunos compuestos con cierto grado de oxigenación, los cuales otorgan el aroma característico de los aceites esenciales (Montoya, 2010).

Los aceites esenciales principalmente son mezclas complicadas de hasta más de 100 elementos que tienen la posibilidad de ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martinez, 2003).

Los aceites esenciales, según su origen, se dividen en naturales, artificiales y sintéticos. Los aceites esenciales naturales se extraen de forma directa de la planta y no padecen

variaciones físico-químicas, sin embargo, son costosos debido a su bajo rendimiento. Los aceites esenciales artificiales se obtienen mediante procesos de enriquecimiento de la misma esencia con 1 o varios de sus componentes. Los aceites esenciales sintéticos son producidos por la mezcla de sus compuestos, la mayoría producidos por procesos de síntesis química, su costo es más bajo, resultando económicos y por ende mayormente utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de limón, fresa, vainilla, etc.) (Martinez, 2003).

La cantidad y composición del aceite esencial varía de una especie a otra y dentro de los mismos géneros de la planta. Los aceites esenciales, se hallan en la planta entera o en diferentes partes de la planta (figura 14), como se muestra a continuación en forma gráfica:



Figura 14. Localización de los aceites esenciales Fuente: Montoya, 2010.

2.4.2. Extracción y aislamiento

Los aceites esenciales se pueden extraer del material botánico a través de diferentes métodos, por ejemplo: destilación con vapor de agua, expresión, extracción con solventes volátiles, Enfleurage y mediante fluidos super-críticos.

En el método de destilación por arrastre con vapor de agua, la materia vegetal se recolecta en estado fresco y se corta en pequeñas porciones. Se coloca dentro de una cámara

cerrada y se somete a corriente de vapor de agua sobrecalentado, el aceite esencial es arrastrado hasta condensarse, recolectarse y ser separado de su fase acuosa. Este procedimiento es muy utilizado para aceites de baja densidad. Así mismo, este proceso se aplica a nivel industrial por su alto rendimiento, la alta pureza del aceite esencial obtenido y debido a que no requiere de tecnología sofisticada. Para la extracción de los aceites esenciales cítricos se utiliza el método de Extracción, en el cual la materia vegetal se exprime hasta liberar el aceite, siendo finalmente recolectado y filtrado.

Para la técnica de extracción con solventes volátiles, se obtiene la muestra seca y molida, la cual será colocada en contacto con solventes como: cloroformo, etanol, alcohol, etc. El volumen del solvente solubiliza al aceite esencial, así como también grasas y ceras, resultando un producto con presencia de impurezas. Este método se aplica a nivel de laboratorio, ya que a grado industrial resulta con altos costos, debido al precio comercial de los solventes, así como por los peligros y riesgos de explosión e incendio durante la manipulación de solventes orgánicos volátiles.

En el proceso de extracción mediante enflorado o enfleurage, la materia botánica (específicamente flores) se coloca en contacto con un aceite vegetal, que actúa como agente de transporte extractor. El aceite esencial se solubiliza en aceite general. Al inicio de la extracción, resulta una mezcla significativa de aceite esencial y aceite vegetal, la cual se separa mediante métodos físico-químicos. Esta técnica se emplea para la extracción de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), sin embargo, implica un bajo rendimiento y un alto costo por la complicada separación del aceite extractor.

La técnica de extracción con fluidos supercríticos, es una de las últimas tecnologías. La materia botánica es cortada en pequeñas raciones, se licua o muele, para ser empacada dentro de una cámara de acero inoxidable y ser sometida a la circulación de un líquido supercrítico por medio de la muestra (ejemplo: bióxido de carbono líquido), los aceites esenciales son solubilizados y arrastrados, mientras que el líquido supercrítico utilizado como solvente extractor se elimina por descompresión progresiva hasta conseguir la presión y temperatura ambiente, hasta finalmente percibirse un aceite esencial puro. Aún cuando muestra algunas ventajas como rendimiento elevado, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina de forma fácil e incluso se puede reprocesar, a pesar de las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no modifican químicamente los elementos del aceite esencial, no obstante, los equipamientos son subjetivamente costosos, debido a que se necesitan bombas de alta presión y sistemas de sustracción además de ser resistentes a las altas presiones (Martinez, 2003).

2.4.3. Usos y aplicaciones

- Industria farmacéutica y dental
- Industria cosmética, de perfumería, del jabón y de los ambientadores
- Productos de usos veterinarios
- Industria fitosanitaria
- Industria alimentaria: Para aromatizar y saborizar licores y café tostado.

A parte de ser aplicado a la conservación de los alimentos y al aumento de la vida eficaz por medio del poder antimicrobiano, a los aceites esenciales se le atribuyen 3 propiedades:

- 1) El carácter hidrofílico-hidrófobo es otorgado por una variación e impregnación en la composición lipídica de la pared celular ocasionando la desnaturalización y posterior destrucción de la célula.

- 2) Los componentes químicos, que aplican como agentes, influyen en la translocación de protones y la fosforilación del Adenosin Trifosfato.
- 3) El tipo de microorganismo al que ataca: las bacterias Gram - tienen mayor susceptibilidad que las Gram + a nivel in-vitro.

Gracias a las características medicinales potenciales, beneficios para la salud y antimicrobianos y características antioxidantes, que los realizan aditivos interesantes en la industria alimentaria. No obstante, la adición directa de aceites esenciales a los alimentos puede dañar de manera negativa la percepción sensorial de alimentos aplicados, para eludir este problema, tienen la posibilidad de integrar aceites esenciales en biopelículas. Como todos comprendemos, el aceite esencial es insoluble en agua, entonces principalmente se disuelve en tensioactivos para obtener una mejor separación en soluciones formadoras de biopelícula (Chouhan, Sharma y Guleria, 2017).

2.4.4. Aceite esencial de orégano

El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta aromática de diminuto arbusto, con una altura entre 40 cm a 1.5 m, las hojas miden cerca de 4 cm, de color verde cenizo, con pelusilla por ambas caras, son característicamente muy olorosas. Así mismo, poseen pequeñas glándulas que contienen el aceite esencial aromático de color amarillo limón, compuesto por estearópteno y 2 tipos de compuestos fenólicos: carvacrol (en porciones mayores) y timol (en proporciones menores). Los tallos se forman a partir de sustancias tánicas y las raíces por estaquiosa, las flores de orégano tienen color blanco, son hermafroditas, el fruto es tetraquenio descompuesto en 4 núculas y las semillas tienen endospermo escaso (Ortega, 2018).

En la estructura química del orégano, se ha reconocido los próximos recursos: 1) Flavonoides (apigenina y luteolina), 2) Agliconas, 3) Alcoholes alifáticos, 4) Compuestos

terpénicos y 5) Derivados del fenilpropano, se han encontrado además 6) Ácidos (coumérico, ferúlico, caféico, r-hidroxibenzoico y vainillico) (Ortega, 2018).

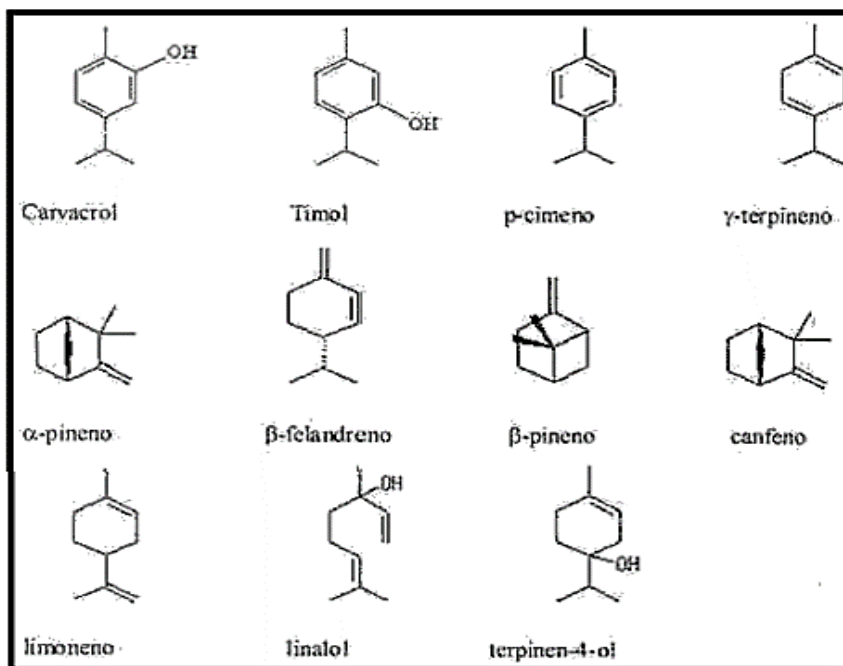


Figura 15. Estructura química de los principales componentes del orégano. Fuente: Ortega, 2018.

Debido al poder bactericida y microcida, el AEO es conocido como el 1er antiséptico de origen natural, así mismo hasta el momento no se tiene conocimiento que el orégano tenga inclinación al desarrollo de resistencia bacteriana, ya que inhibe el aumento de la gran mayoría de bacterias, los compuestos mayoritarios: carvacrol y timol, son los principios activos que en sinergia proporcionan una potente actividad antiséptica (Gallegos, 2003). Debido a la demostración de la nula toxicidad del aceite esencial de orégano se ha aumentado su efectividad (Fan, 2008).

La actividad biológica del aceite esencial de orégano depende de la estructura química, la cual cambia en base a la técnica de extracción y al tipo de planta (datos geográficos, características del ambiente y suelo, período de producción), el aceite esencial de orégano se conforma de 34 elementos activos, siendo los principales: el carvacrol, timol, y-terpineno y p-cimeno (Gómez y López, 2009).

2.4.5. Actividad antimicrobiana

Dentro de las características biológicas del orégano, se encuentran principalmente la actividad antimicrobiana y antioxidante. El timol y el carvacrol son componentes fenólicos de origen natural, conocidos como antioxidantes, agentes antifúngicos y con poder antibacterial, pesticidas e insecticidas encontrados en fracciones significativas dentro de los aceites esenciales (Duke, 2002). Según Alves de Azeredo et al. (2010), presenta gran actividad antibacteriana frente a *Bacillus*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Por otro lado, para Brum et al. (2010), predomina el carácter biocida en diversas especies del género *Candida*.

Para Smith et al. (2005), la Gestión de Alimentos y Drogas de EE. UU. propone que los sabores o “flavors” de los aceites esenciales son identificados como GRAS y pueden ser utilizados en alimentos, es por ello que estos aceites tienen trascendencia en su utilización en la industria alimenticia. Conforme a Bhale et al. (2007) y Dambolena et al. (2010), sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes tienen la posibilidad de ser usadas como conservantes o preservantes de origen natural aplicado en alimentos, que otorga mayor extensión de su vida útil.

2.5. BIOPELICULAS

2.5.1. Generalidades

Una biopelícula o película comestible es una matriz preformada, delgada, que posteriormente será utilizada en forma de recubrimiento del alimento o estará ubicada entre los elementos del mismo. La solución formadora de películas comestibles puede estar constituida por un polisacárido, un compuesto de naturaleza proteica, lipídica o por una mezcla de los mismos (Del Águila, 2019). Es de particular importancia saber que la biopelícula difiere de un recubrimiento comestible, en la forma de elaboración y en la aplicación sobre el alimento. En el caso de las biopelículas, se forma una delgada capa o superficie plana de material comestible, la elaboración se da por separado y se coloca sobre una superficie del mismo nivel, para fines posteriores (Sharma y Rao, 2015). En cambio, un recubrimiento comestible tiene aplicación sobre la superficie del mismo alimento, puede ser por técnica de inmersión en una solución o mediante aspersión (Arredondo, 2012).

Las biopelículas están formuladas con componentes de características físico-mecánicas parecidas a los envases o embalajes no biodegradables y poseen también la funcionalidad de barrera bioactiva, por ejemplo: la agregación de extractos de origen vegetal para la actividad antimicrobiana; protección contra la luz visible y ultravioleta; agentes antioxidantes o colorantes que mejoran la apariencia visual del producto.

Las biopelículas se formulan en base a 3 elementos: el biopolímero, el solvente o disolvente y por último, el agente plastificante.

2.5.2. Elaboración de biopelículas

Los procesos de elaboración que normalmente se utilizan para la producción de biopelículas y recubrimientos son:

- **Eliminación del Disolvente:** Según Cagri, Ustunol y Ryser (2004), se da la formación y estabilización de la composición a nivel molecular mediante uniones físico-químicas. El producto obtenido es una capa de espesor delgado, fácil de desprender; la formulación del producto proviene de la mezcla del disolvente (agua, etanol, ácido acético), aditivos (plastificante, agentes de reticulación y solutos) y un hidrocoloide comestible.

- **Por Gelación Térmica:** Según Carmona, Cordobés, Guerrero, Martínez y Partal (2007), la formación de un gel con estabilidad y composición resistente se da gracias a la aplicación térmica. Este proceso se utiliza para la producción de biopelículas y recubrimientos a base de proteínas, proceso de desnaturalización térmica que da lugar a la formación estable de partículas de su composición.

- **Por Solidificación:** Esta técnica consiste en la obtención de capas delgadas, solidificadas sobre un molde, previamente disueltas hasta la completa homogenización de las macromoléculas y el plastificante (Ávila, Palou, Munguía, Nevárez, Cruz y López, 2012).

- **Método de “Casting”:** Según Escobar, Sala, Silvera, Harispe y Márquez (2009), después de la mezcla de los compuestos de la biopelícula, se procede a la evaporización del disolvente controlando parámetros de temperatura y humedad, para la posterior formación de una capa delgada.

- **“Electrospraying” (Pulverización electro-hidrodinámica):** Jaworek y Sobczyk (2008), esta técnica consiste en la atomización del líquido utilizado para la formulación de biopelículas mediante fuerzas eléctricas; el líquido tiene salida por medio de una boquilla a alto potencial eléctrico. Se obtienen gotas muy pequeñas cuya medida es en nanómetros, así como la carga y la magnitud pueden también controlarse en parte por medios eléctricos.

- Micro-fluidización: Según Monroy-Villagrana, Cano-Sarmiento, Alamilla-Beltrán, Hernández-Sánchez y Gutiérrez-López (2014), este procedimiento consiste en pasar las dispersiones mediante microcanales, produciendo nanopartículas que confieren propiedades físicas superiores a las biopelículas, para más adelante aplicar el método de Casting y así formar la película.

2.5.3. Propiedades mecánicas y físicas

2.5.3.1. Resistencia a la Tracción y Elongación

La estructura química de la biopelícula está relacionada directamente con estas propiedades. Se define a la resistencia a la tracción (RT en MPa) como la máxima resistencia al estiramiento presentada por una biopelícula y a la elongación (E en %) como la cantidad de estiramiento o flexibilidad, ambas propiedades se miden hasta la ruptura de la biopelícula (Yang y Paulson, 2000b). Según los requerimientos de la biopelícula o recubrimiento, se debe utilizar aditivos para potenciar estas propiedades, por ejemplo, en una biopelícula formulada con gelatina y α -tocoferol presenta una baja elongación, lo que se expresa en una disminución del movimiento de las macromoléculas debido a la interacción de dichos componentes (Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan y Tanaka, 2008).

2.5.3.2. Transparencia

Para Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz y Ibarz (2011), la adición de compuestos específicos absorbedores de luz, en espectro ultravioleta-visible, en los alimentos evita que la luz sea catalizadora de procesos de oxidación y con ello también la degradación de componentes nutricionales. Tanto la opacidad como el color tiene relación con las propiedades de barrera en contra de las consecuencias de la luz. Se busca el equilibrio entre la óptima calidad sensorial y nutricional de frutas y hortalizas, sin dejar del lado el brillo, el cual es característica deseable

de dichos productos (Márquez, Trillos, Cartagena y Cotes, 2009). Según Yang y Paulson (2000a), la rancidez de los lípidos es propio de alimentos recubiertos con biopelículas formuladas con vitaminas liposolubles como la E, esto sucede durante el almacenamiento debido al paso de la luz, a pesar de ello dicha vitamina también incrementa la transparencia de las películas y recubrimientos. De igual forma, se ha desarrollado biopelículas para evitar estos problemas, siendo formuladas con extractos de plantas que ayudan en color y opacidad a las biopelículas, de esta forma se comportan como barrera para la luz y la degradación de ácido ascórbico (Hong, Park y Kim, 2000). Según Vartiainen, Vaha y Harlin (2014), el extracto de orégano y de romero son algunos de dichos ejemplos.

2.5.3.3. Permeabilidad al Vapor de Agua

Mediante la ley de Fick y la de Henry, leyes aplicadas para la difusión y solubilidad, específicamente, se calcula la permeabilidad de una barrera. Gracias a esta medida se puede cuantificar el vapor de agua que ingresa a un material (Aider, 2010). El control de la transferencia de la humedad del producto al ambiente se hace en función del movimiento del vapor en el polímero, se busca que este sea el más lento, así mismo depende de la fracción hidrofóbica de los elementos de la biopelícula o recubrimiento. Según los estudios realizados por Bósquez y Vernon, 2005; Miranda, Cárdenas, López y Lara (2003) existe una relación entre la permeabilidad y los tipos de compuestos de las biopelículas.

Para Trejo, Aragón & Miranda, 2001; Ramos, Bautista, Barrera, Bósquez, Alía y Estrada (2010), a medida que aumenta el grosor de la biopelícula incrementa la permeabilidad del agua, este comportamiento ha sido observado en las biopelículas formuladas con quitosano y distintos plastificantes (glicerol, sorbitol, polietilenglicol).

2.5.4. Aplicaciones de biopelículas

En la industria alimentaria, se utilizan biopelículas y recubrimientos aplicados a alimentos, para evitar la ganancia o pérdida de humedad, lo cual influye en la modificación de la textura y rigidez; también provocan retardo en las modificaciones químicas de coloración, aroma y valor nutritivo, actuando como barrera frente al intercambio de gases que tiene influencia en la estabilidad a nivel químico y microbiológico, aparte de prevenir el deterioro mecánico debido a la manipulación de alimentos (McHugh, 2000). Según Salinas, Trejo y Lira (2015), las biopelículas suelen actuar como un microsistema modificando la atmósfera interior de los vegetales, representando así un método de conservación hortofrutícola en estado fresco, dando ventajas al alimento como la reducción significativa de la disminución de peso, agua y el intercambio gaseoso; también el retraso de la senescencia alimentaria y mejora de la calidad sensorial.

Las biopelículas forman una atmósfera modificada pasiva que puede influenciar diferentes cambios en productos frescos y mínimamente procesados en aspectos tales como actividad antioxidante, color, firmeza, calidad sensorial, inhibición de crecimiento microbiano, producción de etileno y compuestos volátiles como resultado de la anaerobiosis (Del Águila, 2019).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La parte de formulación y análisis fisicoquímico de este estudio se desarrolló en el laboratorio de Fisicoquímica de la Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica (DIDITT) del ITP-Instituto Tecnológico de la Producción, ubicado en el Callao.

Asimismo, la extracción del aceite esencial de orégano se llevó a cabo en el laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

El análisis microbiológico se desarrolló en el laboratorio de Investigación y Desarrollo del Departamento de Química Orgánica de la facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1. Materia prima

Las materias primas empleadas en el presente estudio fueron almidón de papa y almidón de maíz adquiridos de laboratorio FRUTAROM S.A.

3.2.2. Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

El aceite esencial fue extraído a partir de hojas secas de orégano (*Origanum vulgare*) compradas del mercado local Unicahi, proveniente del departamento de Tacna y catalogado como calidad Premium. El método de extracción se escogió de acuerdo a la naturaleza y propiedades de la materia prima.

Se utilizó 5 kg de hojas secas de orégano (*Origanum vulgare*), en la etapa de recepción se revisó las características de la materia prima, seleccionando hojas sin magulladuras, manchas oscuras, decoloradas y presencia de impurezas. Como actividades preliminares al proceso de extracción, se realizó la limpieza del hidrodestilador, instalación de mangueras y conexión del equipo junto con la incorporación del agua (15 L) y la materia prima (2.5 kg) para dar inicio a la hidrodestilación por un periodo de 2 horas por cada batch. El proceso inicia con el vapor producido por la ebullición del agua, dicho vapor entra en contacto con las hojas de orégano, arrastrando el aceite esencial hacia el condensador, mediante intercambio de calor, el producto hidrolato (mezcla de vapor condensado y aceite esencial) se receptiona en el florentino. Para la separación de aceite esencial del hidrolato, se utilizó el método de decantación. El aceite esencial orégano (*Origanum vulgare*) es envasado en recipientes de vidrio de color ámbar y almacenado en refrigeración a 4°C.

3.2.3. Insumos

- Sorbitol al 70%
- Gelatina comercial utilizada como emulsificante para facilitar la integración del aceite esencial de orégano en la matriz polimérica a base de polisacárido (almidón) y agua.

3.2.4. Inóculo y medios de cultivo

Las cepas microbiológicas evaluadas fueron:

- *Staphilococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Proteus vulgaris*

- *Bacillus cereus*
- *Salmonella spp.*
- Medio de cultivo Agar Mueller Hilton

3.2.5. Material de laboratorio

- Espátulas o cucharas de metal
- Beakers 100, 250 y 500 mL, marca Pyrex
- Picetas con agua destilada
- Baguetas
- Matraces Elenmeyer 250 y 500 mL, marca Pyrex
- Magnetos
- Argollas
- Pipetas Pasteur
- Frascos de vidrio con tapa rosca 150 mL, marca Kimax
- Tubos falcon
- Frascos ámbar 150 mL
- Placas petri, marca Pyrex
- Algodón, marca CKF
- Campana desecadora conteniendo bromuro de sodio
- Gradilla de acero inoxidable
- Bandejas de luxe
- Plancha de tecnopor
- Papel aluminio
- Papel tisú

- Papel Whatman
- Parafilm
- Frascos blancos con tapa rosca 250 g

3.2.6. Instrumentos y equipos

- Agitador magnético, marca H.W. Kessel
- Agitador de tubos de ensayo - marca Barnstead Inter.
- Balanza analítica tipo digital - marca Ohaus
- Balanza de humedad MA 35 - marca Sartorius
- Balanza electrónica, marca Kessel, modelo GF-160, precisión 0.01 g
- Termómetro digital
- Baño maría Tokio Rikakikai Co. Ltd
- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 950, marca Perkin Elmer precisely
- Estufa por convección forzada Venticell, marca MMM Group
- Homogenizador SilentCrusher M, marca Heidolph
- Texturómetro marca Brookfield, modelo CT 3
- Sonicador Symphony, marca VWR

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. Análisis efectuados en el proceso de elaboración de biopelículas

Después de la elaboración de las biopelículas de todos los tratamientos, se evalúan las propiedades mecánicas (RT y E como variables respuesta), las cuales corresponden al diseño de experimentos:

3.3.1.1. Resistencia a la Tracción

De acuerdo a la norma D882-02 (ASTM, 2002) y con algunas modificaciones, la Resistencia a la Tracción se evaluó utilizando el equipo Texturómetro CT3, marca Brookfield a una humedad relativa constante de $50 \% \pm 5\%$. Inicialmente las biopelículas fueron cortadas en tiras de 2 cm de ancho x 10 cm de largo determinando el espesor. En la computadora acoplada al equipo, se abrió el programa TexturePro CT V1.3 Build 14, encendiendo el texturómetro para ser reconocido por el software mencionado. Se programaron los parámetros del Test como: Identificación de Muestra (Nombre de producto y de Lote), Tipo de Test (Tensión), Objetivo Test (Tipo Objetivo: Distancia, Valor meta: 50 mm), Parámetros generales de Test (Carga de Activación: 15 g, Velocidad de Test trabajada: 1 mm/seg) y Ajuste de Barra ($63.0 \text{ mm} \pm 0.3 \text{ mm}$). Después de la programación, las tiras de la biopelícula fueron colocadas en el equipo quedando ubicada de forma simétrica entre los rodillos. Se procedió a ejecutar la opción Iniciar Test esperando que el equipo emita los datos graficados y un informe en formato PDF (Anexo 1). El resultado se obtiene a partir del promedio de 8 medidas.

Del informe que emite el texturómetro, se utilizan los valores de Pico Carga para ser remplazados en la siguiente ecuación:

$$\text{Resistencia a la tracción} \left(\frac{N}{\text{mm}^2} \right) = \frac{\text{Fuerza (N)}}{\text{Área (mm}^2\text{)}}$$

$$\text{Fuerza (N)} = \text{Masa} \times 9.8 \frac{m}{s^2}$$

$$\text{Masa (kg)} = \text{Pico Carga} \times 10^{-3}$$

$$\text{Área (mm}^2\text{)} = \text{Espesor} \times \text{Ancho de la muestra}$$

3.3.1.2.Elongación

La elongación de las biopelículas se determina mediante la norma D882-02 (ASTM, 2002) con algunas modificaciones mencionadas, utilizando un texturómetro CT3 (Brookfield) de acuerdo al ítem 3.3.1.1. El resultado se obtiene a partir del promedio de 8 medidas.

Del informe emitido por el texturómetro, se utilizan los valores de Deformación según Pico Fuerza para ser remplazados en la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Elongación (\%)} : \frac{\text{Deformación según Pico Fuerza}}{\text{Largo de la muestra}} \times 100$$

3.3.2. Análisis efectuados al aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

3.3.2.1.Actividad Antimicrobiana

La técnica de difusión en agar (Mueller Hilton) ha sido utilizada para este análisis. Las cepas bacterianas evaluadas fueron: *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.* Cada microorganismo fue aislado de cada cepa en su medio específico, agregando solución salina al 0.85% en cantidad de 5 mL. Las concentraciones se ajustan con el tubo Número 0.5 tipo Mc Farland (1.5×10^8 UFC/mL). De la suspensión previamente ajustada, se toman 100 μ l y se lleva a sembrar en agar para cada cepa bacteriana, en cada placa se colocan 3 discos esterilizados de papel Whatman de 5 mm impregnados con 10 μ l del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*). Las placas tipo Petri fueron incubadas a 35 °C por 24 horas, después de la incubación se realizó la lectura de los halos de inhibición (mm). Cada tratamiento tuvo dos réplicas. La actividad antimicrobiana fue determinada mediante los halos de inhibición (mm), siguiendo la siguiente relación:

$$C = A - B$$

$$C = \text{Tamaño del halo de inhibición (mm)}$$

$A = \text{Tamaño del halo} + \text{disco del papel filtro (mm)}$

$B = \text{Tamaño del disco del papel filtro (5mm)}$

3.3.3. Caracterización de la biopelícula en el tratamiento seleccionado y con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

3.3.3.1. Propiedades Mecánicas de la biopelícula

a) Resistencia a la Tracción (MPa)

Este análisis se determina según la descripción del ítem 3.3.1.1. El resultado se obtiene a partir del promedio de 8 medidas.

b) Elongación (%)

Este análisis se determina según la descripción del ítem 3.3.1.2. El resultado se obtiene a partir del promedio de 8 medidas.

3.3.3.2. Propiedades Físicas

a) Espesor (mm)

Se determina mediante la medición con un micrómetro. El resultado se obtiene a partir del promedio de 8 medidas realizadas a una sección de biopelícula de 2 cm de ancho x 10 cm de largo.

3.3.3.3. Propiedades Antimicrobianas

a) Actividad Antimicrobiana

Se utilizó la técnica de Song, Zuo y Chen (2017) con algunas modificaciones, se emplearon los cultivos bacterianos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus* y *Salmonella spp.*, obtenidos del Laboratorio de Microbiología de la

Dirección de Investigación, Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica (DIDITT) del Instituto Tecnológico de la Producción. Las bacterias se activaron en una solución salina NaCl al 0.85 %, estas se agitaron en un Vortex hasta disolver el inóculo. La turbidez de los tubos con las cepas bacterianas fue comparada con el patrón Mc. Farland 0.5 (mantener en refrigeración a 4 °C).

Se inoculó 100 uL de cada solución bacteriana en placas Petri con Agar Mueller Hilton, mediante la técnica de difusión en agar para evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana de las biopelículas ante las cepas bacterianas.

Se obtienen discos de $D = 15$ mm ($D =$ diámetro) para las biopelículas del Control, 1% AEO y 2.5% AEO y se ubican en el centro de la placa Petri. Las placas se mantuvieron en refrigeración durante 3 horas permitiendo que el aceite esencial se difunda en el medio de cultivo y después se incubaron a 35°C por 24 horas. Para la actividad antimicrobiana de la biopelícula se evalúa la formación del halo de inhibición, en el agar y alrededor de la biopelícula.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.4.1. Obtención de biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz-papa, sorbitol y aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

El flujograma de elaboración de biopelículas y con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), se muestra a continuación en la figura 16:

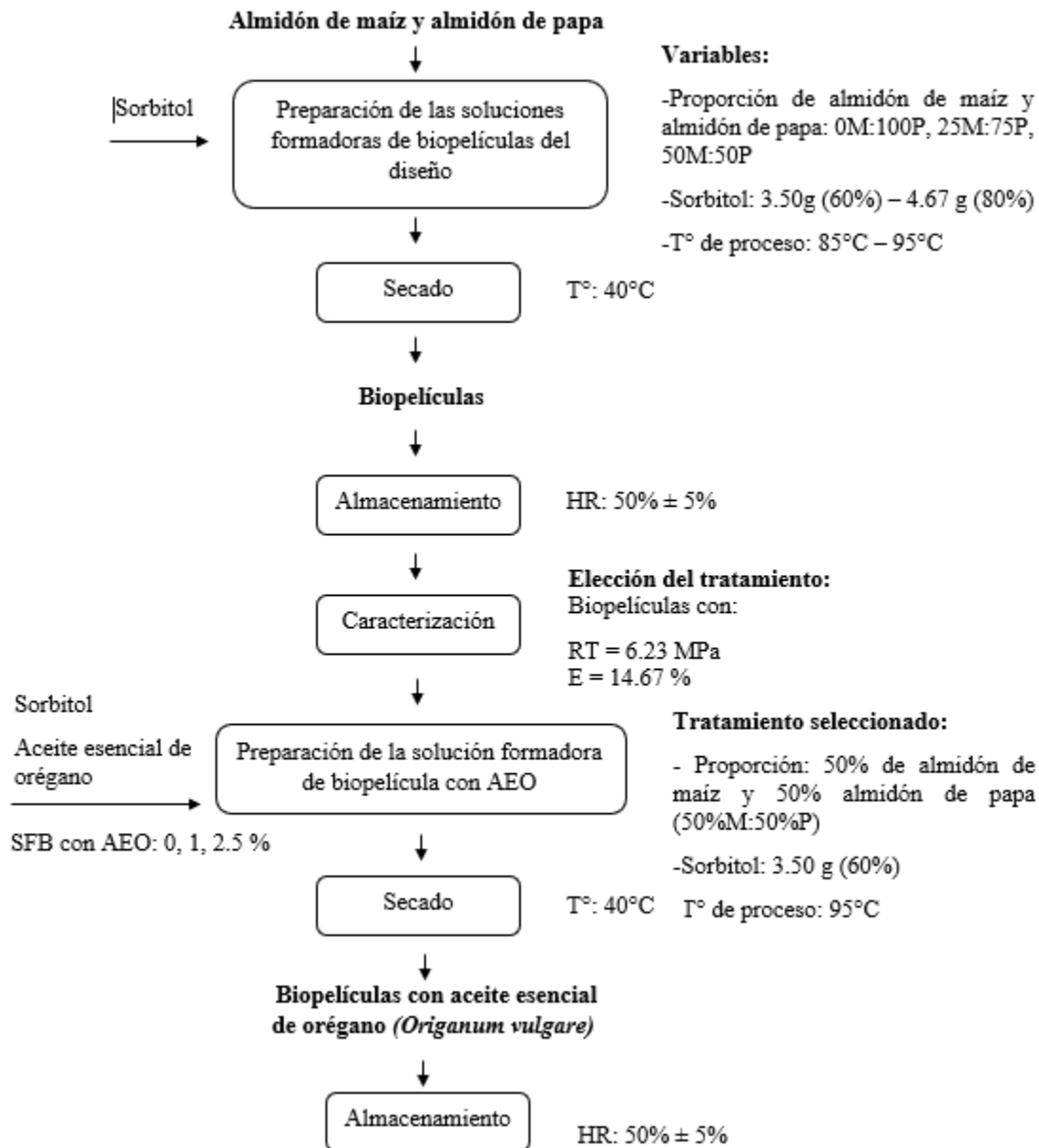


Figura 16. Flujograma de elaboración de biopelículas y con aceite esencial de orégano. Fuente: Elaboración propia, 2020.

3.4.2. Descripción del Proceso

3.4.2.1. Elaboración de la solución de biopelícula del diseño factorial multinivel

La elaboración de biopelículas se realiza mediante el método de casting o moldeo, se prepararon concentraciones de 4% p/p de almidón, considerando las proporciones 0M:100P,

25M:75P, 50M:50P, “M” de almidón de maíz y “P” de almidón de papa respectivamente. La mezcla de almidones se disolvió en una fracción de agua fría, se trasvasó a un matraz que contenía la fracción restante de agua caliente. La solución formadora de biopelícula (SFB) se llevó a agitación constante en el agitador magnético, según la temperatura de proceso (85°C, 95°C) a 600 RPM, manteniendo constante la temperatura de gelatinización durante 1 hora y adicionando el plastificante Sorbitol al 60% y 80% del peso total del almidón en la solución, estos porcentajes de sorbitol fueron seleccionados en base a la literatura científica y a experimentos preliminares realizados en el DIDITT. La cantidad de plastificante estuvo en función al peso del almidón en base seca y se mantuvo bajo la misma temperatura y agitación durante 30 minutos. Durante toda la agitación, se realizó la medición de temperatura de la SFB cada 20 minutos. Terminada la agitación, la SFB fue sonicada por 10 minutos a 40° C con el objetivo de eliminar las burbujas (Anexo 2).

3.4.2.2.Secado

La SFB se colocó en bandejas de plástico con un peso de 40 g y fueron secadas en una estufa con temperatura controlada a 40 °C durante 18 horas.

3.4.2.3.Almacenamiento

Después del secado, se realizó el acondicionamiento de las biopelículas en un desecador con bromuro de sodio a 25°C y 50% \pm 5% HR por 48 horas.

3.4.2.4.Caracterización

Para determinar las propiedades mecánicas en el texturómetro, se mantuvo constante las condiciones ambientales de 50% \pm 5% HR, en este momento se procedió a cortar las biopelículas

en 8 tiras de 2 cm x 10 cm por cada tratamiento y determinando el espesor con un micrómetro Mitutoyo.

3.4.2.5.Preparación de la solución con la mejor formulación de biopelícula y con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Después de la elección del tratamiento que presentó las mejores propiedades mecánicas se llevó a cabo la elaboración de biopelículas con aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), para determinar la actividad antimicrobiana de la biopelícula en 3 concentraciones de AEO frente a 5 cepas bacterianas.

Las biopelículas del tratamiento conveniente de la primera etapa, se elaboraron mediante la metodología mencionada en el acápite 3.4.2.1. hasta finalizar la sonicación. Se preparó una solución a 40°C de gelatina al 2%. La nueva mezcla se conformó de SFB y gelatina en una proporción de 95:5. Se adicionó 0%, 1% y 2.5% de AEO y se homogenizó a 13500 RPM POR 1' y a 20500 RPM por 3', terminada la homogenización, la SFB se colocó nuevamente en el sonicador durante 10 minutos a 40° C para eliminar las burbujas (Anexo 3).

3.4.2.6.Secado

La SFB se colocó en bandejas de plástico con un peso de 40 g y fueron secadas en una estufa con temperatura controlada a 40 °C durante 18 horas.

3.4.2.7.Almacenamiento

Después del secado, se realizó el acondicionamiento de las biopelículas en un desecador a 25 °C y 50 % ± 5 % HR por 48 horas. Después del secado, las biopelículas se destinaron para la determinación de la actividad antimicrobiana.

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.5.1. Biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz-papa y sorbitol

Para esta etapa 1, se utilizó un diseño factorial multinivel $2 \times 2 \times 3$ conformado por 2 concentraciones de sorbitol, 2 temperaturas de proceso y 3 proporciones de almidón de maíz y de papa, como se muestra en la Tabla 1. Se consideró conveniente codificar los niveles de las proporciones de almidón de maíz y de papa con valores de 0, 25 y 50 correspondiendo a las proporciones de almidón de maíz en la mezcla, debido a que el diseño utilizado no permite el uso de niveles alfanuméricos. La selección de los niveles en cada factor se decidió en base a la literatura científica y con experimentos preliminares. La Resistencia a la tracción-RT y Elongación-E fueron las variables respuesta. Este diseño se utilizó para determinar la combinación de niveles de los factores a fin de encontrar el mejor desempeño del proceso (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

El diseño factorial $2 \times 2 \times 3$ consistió en 12 tratamientos con 1 réplica, obteniendo aleatoriamente 24 corridas experimentales como se muestra en la Tabla 2. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statgraphics 18. Se utilizó el análisis de varianza para verificar la significancia de las variables en estudio. Las variables independientes con valor de probabilidad p del estadístico F ($\text{prob} > F$) menores al nivel de significancia ($\alpha = 0,05$) fueron consideradas dentro de los efectos significativos. La Diferencia Mínima Significativa (LSD) fue usada con el 95% del nivel de confianza.

Tabla 1

Variables independientes con sus respectivos niveles

Variable del proceso	Niveles		
Sorbitol (%)	60	80	
Temperatura de proceso (°C)	85	95	
Proporción de almidón de maíz y almidón de papa	0 (0 M:100 P)	25 (25 M:75 P)	50 (50 M:50 P)

Fuente: Autoría propia, 2020.

Tabla 2

Diseño factorial multinivel 2x2x3 utilizado en la elaboración de biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz - papa y sorbitol

Run	Sorbitol (%)	Temperatura de proceso (°C)	Proporción de almidón de maíz y almidón de papa*
1	60	85	50
2	80	95	0
3	60	85	0
4	60	95	0
5	60	95	50
6	60	95	25
7	80	85	25
8	80	85	0
9	60	85	25

10	80	85	50
11	80	95	50
12	80	95	25

*Leyenda: 0 = 0% almidón de maíz y 100% almidón de papa; 25 = 25% almidón de maíz y 75% almidón de papa; 50 = 50% almidón de maíz y 50% almidón de papa.

Fuente: Autoría propia, 2020.

3.5.2. Biopelículas a base de una mezcla de almidón de maíz-papa, sorbitol y aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Después de la determinación del mejor tratamiento en la etapa 1, se busca determinar el % de AEO que presenta el mayor valor de actividad antimicrobiana, como variable de respuesta. Se utilizó un diseño factor categórico individual con un solo factor (Concentración expresado en % de aceite esencial de orégano) en tres niveles, con una réplica, como se muestra en la Tabla 3. La selección y rango de los factores se decidió sobre la base de la literatura científica y experimentos preliminares. La variable de respuesta fue la actividad antimicrobiana. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa Statgraphics 18. Se utilizó el análisis de varianza para verificar la significancia de las variables en estudio. Las variables independientes con valor de probabilidad p del estadístico F ($\text{prob} > F$) menores al nivel de significancia ($\alpha = 0,05$) fueron consideradas dentro de los efectos significativos. La Diferencia Mínima Significativa (LSD) fue usada con el 95% del nivel de confianza.

Tabla 3

Diseño utilizado para las biopelículas con AEO

Tratamiento	Concentración de AEO (%)
T1	0% (Control)
T2	1.0 %
T3	2.5 %

Fuente: Autoría propia, 2020.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. EVALUACIÓN DE LA MEJOR FORMULACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS A BASE DE ALMIDÓN DE MAÍZ-PAPA

4.1.1. Efecto de las variables de concentración de sorbitol, temperatura de proceso y proporción de almidón de maíz-papa

Para la elaboración de biopelículas bajo las mejores condiciones se determina el impacto de las variables: concentración de sorbitol, temperatura de proceso y proporción de almidón de maíz y almidón de papa sobre las propiedades mecánicas de la biopelícula.

Mediante el método de casting y las condiciones de elaboración utilizadas en el presente estudio se obtuvieron biopelículas con apariencia y espesor deseables. Estas biopelículas resultaron ser fácilmente desprendidas de la superficie de fundición y eran visualmente homogéneas sin separación de fases, grietas o burbujas, también se observó que la transparencia de la biopelícula disminuye a medida que se incrementa la proporción de almidón de maíz, estas observaciones se muestran en el anexo 4.

Como se muestra en la tabla 4, se puede ver el promedio de las medidas de resistencia a la tracción y elongación de las biopelículas para cada tratamiento utilizado, frente a los efectos interrelacionados de las variables de concentración de sorbitol, temperatura de proceso y proporción de almidón de maíz y almidón de papa. Las medidas de RT se encontraron dentro de un rango de 2.06 MPa – 7.04 MPa, mientras que los de elongación oscilaron entre 14.67 % hasta 37.14 %.

Tabla 4

Valores experimentales de resistencia a la tracción en cada tratamiento

Tratamiento	Sorbitol (%)	Temperatura de proceso (°C)	Proporción de almidón de maíz y almidón de papa	Resistencia	
				a la tracción (MPa) experimental	Elongación (%) experimental
1	60	85	50	5.32	23.91
2	80	95	0	2.24	29.17
3	60	85	0	4.00	25.84
4	60	95	0	4.84	21.05
5	60	95	50	6.23	14.67
6	60	95	25	7.04	23.02
7	80	85	25	4.51	37.14
8	80	85	0	2.06	33.74
9	60	85	25	5.84	27.30
10	80	85	50	4.71	34.68

11	80	95	50	4.62	28.62
12	80	95	25	3.84	28.75

Fuente: Autoría propia, 2020.

La evaluación del efecto de las variables y su interrelación mediante análisis estadístico sobre la resistencia a la tracción (Anexo 5) y elongación (Anexo 6). El análisis de varianza (ANOVA) determina efectos principales y de interacción con el fin de evaluar los efectos que explican las respuestas de las propiedades mecánicas.

En el ANOVA, se observa que para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ en la respuesta de resistencia a la tracción, los efectos significativos fueron los efectos principales, la interacción concentración de sorbitol - temperatura de proceso y la interacción concentración de sorbitol - proporción de almidón de maíz y almidón de papa, confirmando que las 3 variables independientes influyen sobre el proceso con valor significativo, así mismo el efecto más importante sobre la respuesta, es el % sorbitol, por tener el mayor valor de Razon-F. Para elongación, los efectos significativos fueron la concentración de sorbitol y la temperatura de proceso, siendo el más importante el efecto del sorbitol, por tener el mayor valor de Razon-F.

Como se observa en la figura 17(a), la relación de resistencia a la tracción vs. sorbitol es indirectamente proporcional en los niveles de 60% y 80%. Los resultados del presente estudio se encuentran dentro de los valores reportados por Ballesteros, Pérez y Andrade (2020), para biopelículas de almidón de camote formuladas con 2 plastificantes, glicerol y sorbitol, con un rango de respuesta de 1.76 a 9.78 MPa y 4.95 a 9.37 MPa respectivamente, observando que a medida que aumenta el plastificante, la respuesta disminuye independientemente del tipo de

plastificante añadido (glicerol o sorbitol). Isotton, Bernardo, Baldasso, Rosa y Zeni (2015) muestran la misma relación para películas de almidón de maíz, este comportamiento está relacionado con las modificaciones estructurales de la red de almidón cuando se incorporan las diferentes cantidades del aditivo, ya que se mezclan e intercalan entre las cadenas del polímero, interrumpiendo los enlaces de hidrógeno y separando las cadenas poliméricas provocando así el aumento de la flexibilidad, en pocas palabras la matriz de la película se vuelve menos resistente a medida que el porcentaje del plastificante incrementa.

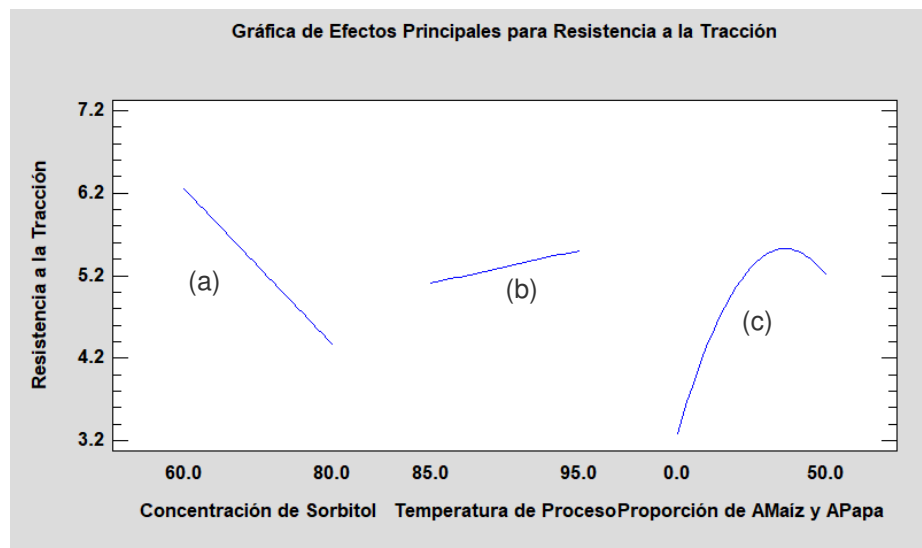


Figura 17. Efectos principales para la resistencia a la tracción. Fuente: Autoría propia, 2020.

Según la figura 17(b), la temperatura de proceso en los niveles de 85°C y 95°C influye ligeramente sobre la resistencia a la tracción, esta dependencia se utiliza para la conversión de los gránulos de almidón en películas. Según Thakur, Pristijono, Scarlett, Bowyer, Singh y Vuong (2019) este efecto se genera por los cambios impulsados por la temperatura alterando la región cristalina.

En la figura 17(c), para las proporciones de almidón de maíz y papa se observa que la resistencia a la tracción, aumenta a medida que se incrementa la proporción de almidón de maíz, este comportamiento se asemeja a lo reportado por Caamal, Pereira y Madera (2011), quienes mencionan que existe un efecto sinérgico por parte de las mezclas binarias. Sin embargo, según lo observado en la figura 17(c), existe un punto en el que el sistema polimérico se satura y empieza a disminuir el valor de la respuesta. Datta y Halder (2019), reportaron que las películas de almidón de maíz obtuvieron una resistencia mínima a la tracción de 2.21 MPa mientras que las películas de almidón de papa mostraron una resistencia a la tracción más alta de 3.16 MPa, lo que puede deberse a su menor contenido de amilosa (21%) que el almidón de maíz (28%), así mismo encontraron que las propiedades de tracción de las películas de almidón mixto (maíz y papa) fueron de 3,14 MPa, lo que difiere con los valores reportados en el presente estudio. Por otra parte, según Guo, Liu, Xu, Zhang, Bian y Wei (2019) mencionan que las películas con mayores cantidades de amilosa normalmente poseen mejores características de formación de película que incluyen resistencia mecánica y alargamiento.

Según Orsuwan y Sothornvit (2018), cabe resaltar que la alta disminución de la resistencia a la tracción está asociada con la estructura química de los plastificantes, el glicerol (92 g/mol) tiene menor masa molecular a comparación del sorbitol (180 g/mol), lo que permite inducir más fácilmente la creación de espacios intermoleculares entre cadenas de polímero disminuyendo el número de enlaces de hidrógeno unidos a las cadenas de almidón, dicho mecanismo de plastificación se muestra en la figura 18.

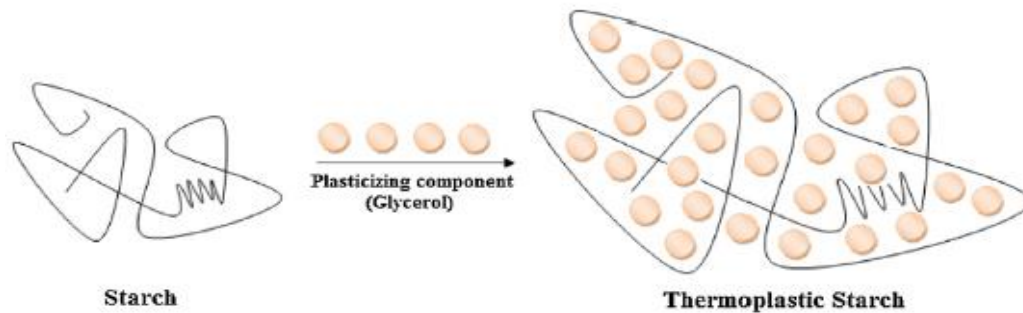


Figura 18. Almidón plastificado. Fuente: Datta y Halder, 2019.

El comportamiento de la elongación frente a los efectos se presenta en la figura 19, la elongación aumenta a mayor porcentaje de plastificante y disminuye conforme incrementa la temperatura de proceso. Los resultados del presente estudio superan lo reportado por Ballesteros *et al.* (2020), 1.84 a 9.00% en películas con sorbitol, sin embargo, de igual forma afirman que el plastificante logró el efecto de bloqueo al interferir con la interacción intermolecular aumentando el volumen libre en la matriz polimérica. Este aumento de respuesta también se debe a la mayor ocupación del espacio a través de los enlaces de hidrógeno del plastificante, lo que probablemente interrumpe la estructura del polímero y se convierte en una estructura con mayor movilidad.

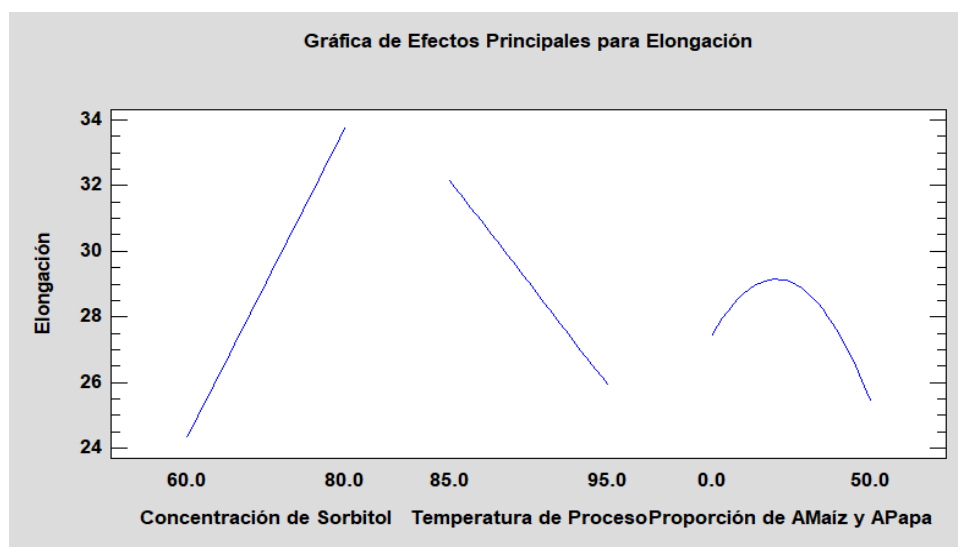


Figura 19. Efectos principales para la elongación. Fuente: Autoría propia, 2020.

Según el análisis de varianza (ANOVA), existe interacciones de factores significativos, tal como se muestra en la figura 20, la resistencia a la tracción es mayor para las biopelículas con 60% de sorbitol en la matriz polimérica a una temperatura de 95°C. Por otro lado, se observa que las biopelículas elaboradas con una mezcla de 50% almidón de maíz y 50% almidón de papa, presentan mayores resistencias a la tracción, específicamente en el menor nivel de plastificante, por lo que se comprueba la afirmación de Thakur *et al.* (2019) que las propiedades de biopelículas a menudo se relacionan con las interacciones que dependen de la concentración de los componentes.

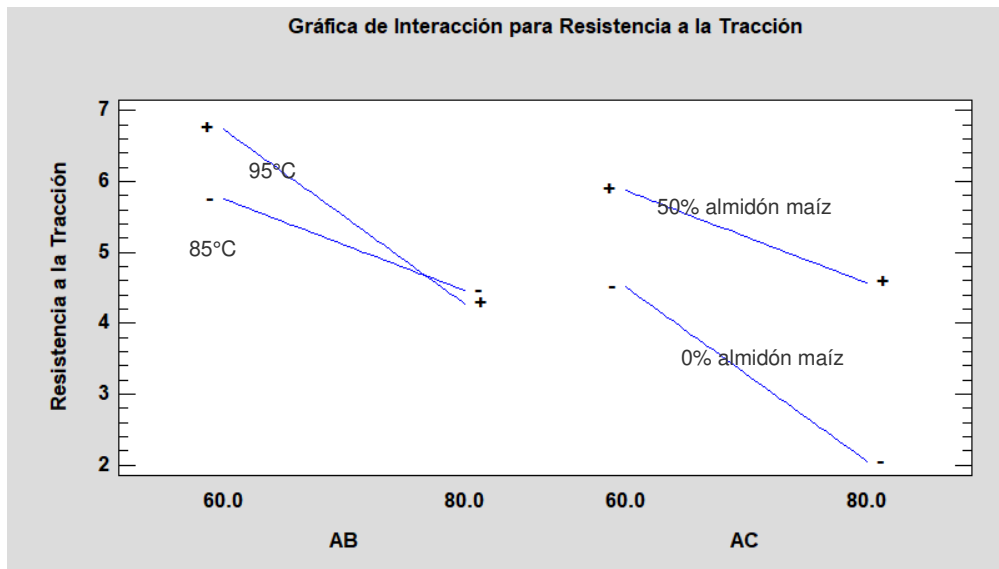


Figura 20. Interacciones significativas para la resistencia a la tracción. Fuente: Autoría propia, 2020.

4.1.2. Elección de la mejor formulación en base a las propiedades mecánicas

La elección del mejor tratamiento se decidió en base a los experimentos realizados y a la literatura científica, para lo que se espera seleccionar un tratamiento con alto valor de RT y menor valor de E, con el fin de evitar saturar el sistema en presencia del aceite esencial de orégano

(*Origanum vulgare*). En los análisis de varianza mostrados en las tablas 5 y 6, se observa que el p-value es menor que 0.05, es decir genera diferencias significativas entre la media de las propiedades mecánicas de los tratamientos analizados con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 5

Análisis de Varianza para Resistencia a la tracción por tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	47.3751	11	4.30683	45.43	0.0000
Intra grupos	1.13755	12	0.0947958		
Total (Corr.)	48.5127	23			

Fuente: Autoría propia, 2020.

Tabla 6

Análisis de Varianza para Elongación por tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	861.018	11	78.2744	10.29	0.0002
Intra grupos	91.269	12	7.60575		
Total (Corr.)	952.287	23			

Fuente: Autoría propia, 2020.

Después de observar que se rechaza H_0 mediante ANOVA, se concluye que no hay igualdad entre las medias poblacionales como se muestra en la figura 21, la media de mayor valor es la del tratamiento 6 con 7.04 MPa, seguido del tratamiento 5 con 6.23 MPa y el tratamiento 9 con 5.84 MPa, estos dos intervalos de confianza se traslapan, es decir son estadísticamente iguales

en cuanto a su media, en lo que se puede elegir al tratamiento 6 por su alto valor. Por otro lado, para la elongación que se aprecia en la figura 22, el tratamiento 5 es el menor de todos con una media de 14.67%, seguido por los tratamientos 4, 6, 1 y 3 que son estadísticamente iguales. En base a estos resultados y esperando obtener las condiciones adecuadas de elaboración de biopelículas, se decide seleccionar el tratamiento 5, por ser uno de los tratamientos con alta resistencia a la tracción y el mínimo valor en elongación. La selección de los niveles del tratamiento 5 son 60% de sorbitol, 95°C de temperatura de proceso y 50% proporción del almidón de maíz y 50% de almidón de papa.

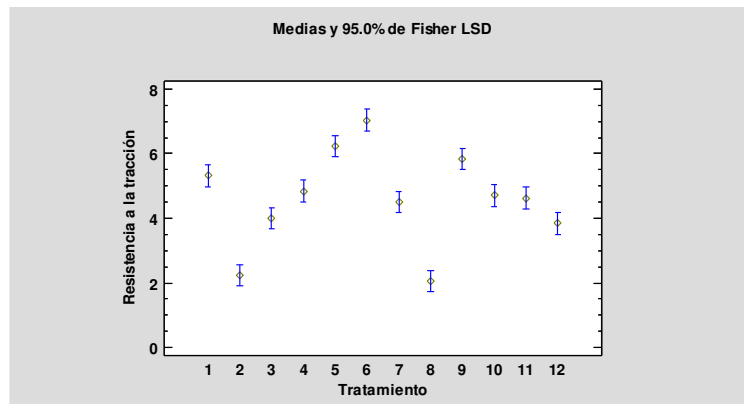


Figura 21. Pruebas de Múltiple Rangos para Resistencia a la tracción por Tratamiento. Fuente: Autoría propia, 2020.

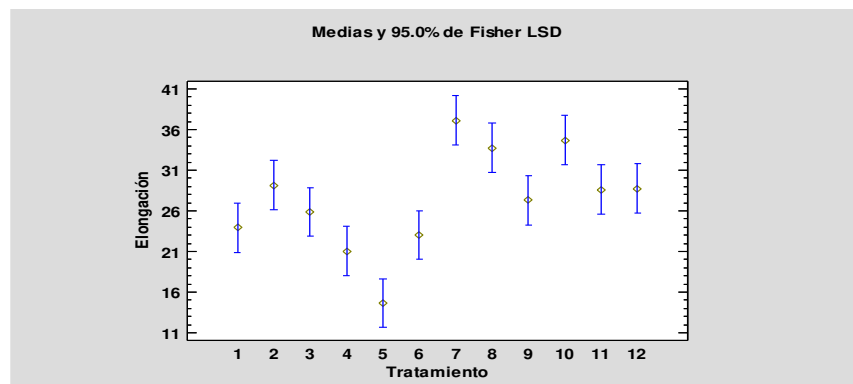


Figura 22. Pruebas de Múltiple Rangos para Elongación por Tratamiento. Fuente: Autoría propia, 2020.

4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL AEO-ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

El volumen extraído de aceite esencial de orégano fue 46 mL, siendo la cantidad inicial de materia prima de 5 kg, con un periodo de extracción de 4 horas. Este aceite se utilizó como agente antimicrobiano para las biopelículas, por lo que inicialmente se determinó su actividad antimicrobiana frente a 5 cepas bacterianas, en la tabla 7 se observan las medidas cualitativas, debido a la forma del halo de inhibición no se permitió realizar una medición.

Tabla 7

Actividad antimicrobiana de AEO-aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Cepas bacterianas	Halos de inhibición
<i>Escherichia coli</i> (gram -)	Se observó formación de halo
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram +)	Se observó formación de halo
<i>Proteus vulgaris</i> (gram -)	Se observó formación de halo
<i>Bacillus cereus</i> (gram +)	Se observó formación de halo
<i>Salmonella spp.</i> (gram -)	No se observó formación de halo

Fuente: Autoría propia, 2020.

El AEO demostró un efecto inhibitor sobre los microorganismos testeados: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* y *Bacillus cereus*. El AEO no inhibió el crecimiento

del microorganismo probado *Salmonella spp.* Como se muestra en la figura 23, las zonas inhibitorias de AEO eran más grandes en este orden *Bacillus cereus*, seguido de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y por último *Proteus vulgaris*.

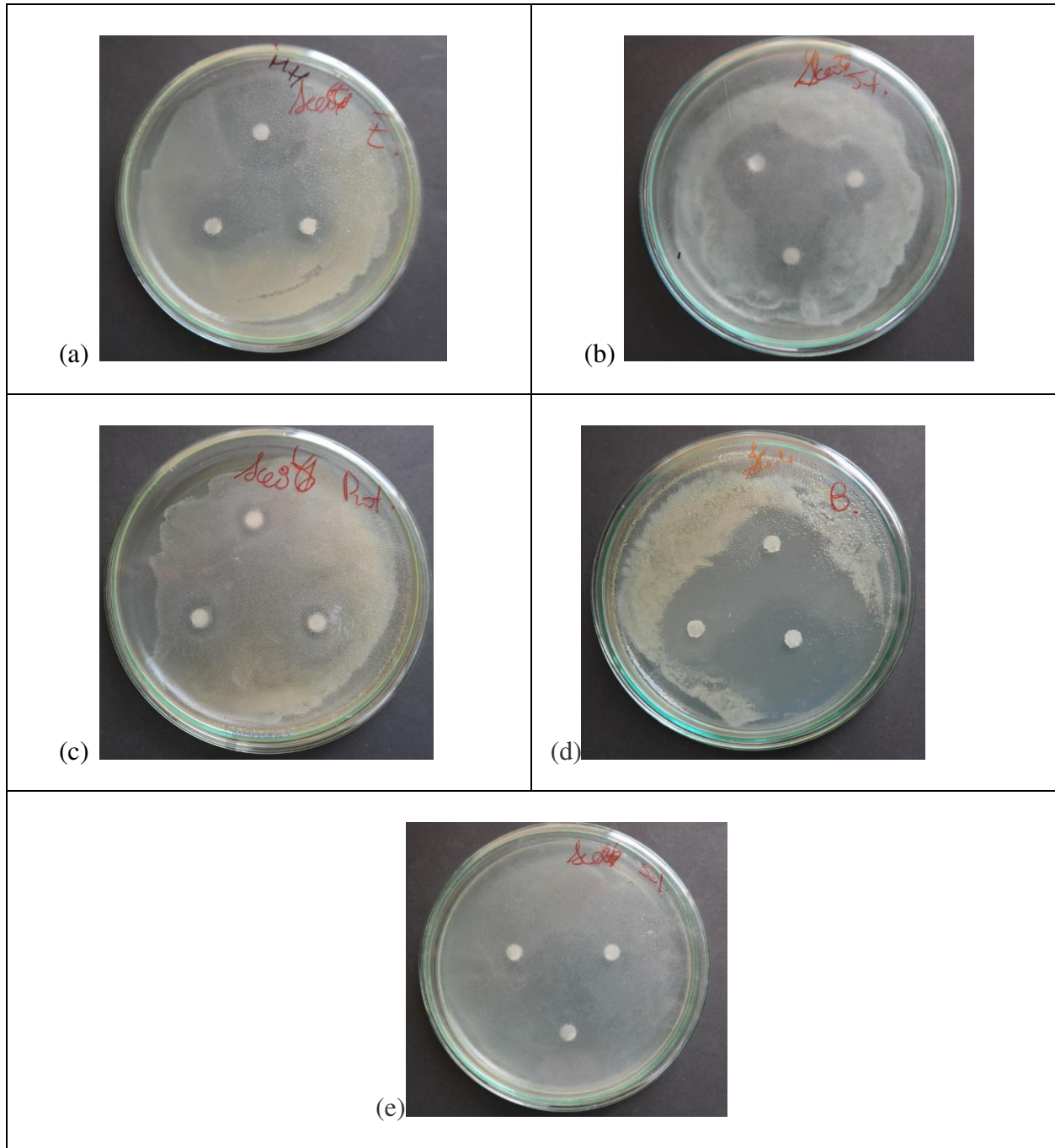


Figura 23. Actividad antimicrobiana del AEO frente a (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus*, (c) *Proteus vulgaris*, (d) *Bacillus cereus* y (e) *Salmonella spp.* Fuente: Autoría propia, 2020.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (AEO) y canela (CEO) inhibió a todos los microorganismos estudiados: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis* y *Shigabacillus* (Wu *et al.*, 2014). También reportó que el AEO formó zonas inhibitorias más grandes que las del CEO, excepto en el microorganismo probado *Salmonella enteritidis*. Pellissari, Grossmann, Yamashita y Pineda (2009) reafirmaron que las fracciones del AEO tienen capacidad antimicrobiana frente a algunas bacterias, como *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella*. Por lo tanto, se seleccionó AEO para preparar la película antimicrobiana. Pazmiño, Campuzano y Marín (2020), reportaron que el aceite esencial de orégano inhibió a *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* Estos resultados demuestran que el aceite esencial de orégano desarrolla su propiedad antimicrobiana fundamentalmente en base a sus principios activos, carvacrol y timol, que provocan la lisis bacteriana (Calo, Crandall, O'Bryan y Ricke, 2015; y Lambert, Skandamis, Coote y Nychas, 2001).

4.3. ELABORACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE UNA MEZCLA DE ALMIDÓN DE MAÍZ, DE PAPA, SORBITOL Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

En esta etapa se elaboraron biopelículas con la formulación seleccionada en el ítem 4.1.2. A esta formulación se adiciona el AEO, para la posterior evaluación antimicrobiana de la biopelícula.

4.3.1. Efectos de la variable Concentración de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

La Tabla 8 muestra la actividad antimicrobiana de las biopelículas con 0, 1 y 2.5% de AEO. Se observó que los films con AEO al 1% y 2.5% de AEO inhibieron a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. No se observó actividad antimicrobiana de las biopelículas para las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris* en las concentraciones de 1 y 2.5% de AEO. Para el caso de *Salmonella spp.* se observó un efecto inhibitorio a una concentración de 2.5 % de AEO en la biopelícula.

Tabla 8

Actividad antimicrobiana de la biopelícula con aceite esencial de orégano (Origanum vulgare)

Microorganismos	Zona inhibitoria (mm)		
	0 % AEO	1.0 % AEO	2.5 % AEO
<i>Escherichia coli</i>	0	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	7.72	8.93
<i>Proteus vulgaris</i>	0	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i>	0	5.50	7.09
<i>Salmonella spp.</i>	0	ND	2.25

*ND= No determinado

Fuente: Autoría propia, 2020.

Se realizó el análisis estadístico mostrado en la Tabla 9 y Tabla 10, para determinar la respuesta del % de AEO sobre la actividad antimicrobiana mediante la zona de inhibición. El ANOVA, presenta que para $\alpha = 0,05$ la concentración de AEO en la biopelícula es un efecto significativo sobre la respuesta de inhibición de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 9

Tabla ANOVA para Inhibición de Bacillus cereus por Concentración de AEO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	55.6281	2	27.8141	5715.22	0.0000
Intra grupos	0.0146	3	0.00486667		
Total (Corr.)	55.6427	5			

Fuente: Autoría propia, 2020.

Tabla 10

Tabla ANOVA para Inhibición de Staphylococcus aureus por Concentración de AEO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	88.9324	2	44.4662	1065.48	0.0001
Intra grupos	0.1252	3	0.0417333		
Total (Corr.)	89.0576	5			

Fuente: Autoría propia, 2020.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las biopelículas contra cinco bacterias seleccionadas, *Escherichia coli* (gram -), *Staphylococcus aureus* (gram +), *Proteus vulgaris* (gram -), *Bacillus cereus* (gram +) y *Salmonella spp.* (gram -). La película de control (sin AEO) no mostró algún efecto antimicrobiano contra los 5 microorganismos estudiados, lo que resulta en zonas sin inhibición según la Tabla 8. Los resultados van concordancia con Gómez, Bravo, Gómez, Alemán y Montero (2009) y Fakherddin, Mojgan y Farahmandghavi (2015) quienes reportan que las películas comestibles sin AEO no mostraron actividad antibacteriana contra *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus acidophilus* y *Listeria innocua*. En los resultados del presente estudio se observaron áreas de inhibición (P <0.05) contra las dos cepas microbianas *Staphylococcus aureus* (gram +) y *Bacillus cereus* (gram +) en las biopelículas formuladas con 1% y 2.5% de

AEO. También se observa que conforme incrementa la concentración de AEO aumenta el área de inhibición contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, de 7.72 mm hasta 8.93 mm y de 5.50 mm hasta 7.09 mm respectivamente, estos valores fueron menores a los reportados por Liu, Wang, Qi, Huang y Xiao (2018) para películas de matri

z polisacárido - proteína y AEO contra *Staphylococcus aureus*. Esto demuestra según Liu *et al.* (2018) que las emulsiones con mayor concentración de AEO se inmovilizaron en la matriz de la biopelícula. Por otro lado, la falta de actividad antimicrobiana contra las demás cepas bacterianas se explica mediante la volatilización del AEO durante la fabricación de films. Así mismo, las películas comestibles al 2.5% se muestran visualmente incompatibles a utilizar, debido a los agujeros pronunciados, falta de homogeneidad, desagradable olor y al color oscuro observado en la superficie de la biopelícula como se muestra en la figura 24.

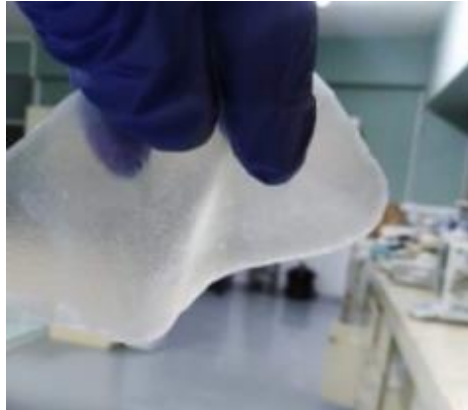


Figura 24. Biopelícula al 2.5% de AEO. Fuente: Autoría propia, 2020.

Según Fakherddin *et al.* (2015), las películas incorporadas con 0.8% AEO mostraron cierto efecto inhibitorio contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. enteritidis*, mientras que la leve inhibición se encontró para *E. coli*. Por otra parte Benavides, Villalobos y Reyes (2012), afirman que la concentración mínima de AEO a la que las películas comienzan a exhibir actividad antibacteriana

es con la incorporación del 1% AEO, valor acorde al presente estudio. El efecto antibacteriano del AEO se ha atribuido principalmente a fracción terpenoide del orégano compuesta por carvacrol, timol y p-cimeno (Corrales, Fernández y Han, 2014) . Se expresó que carvacrol forma canales a través de la membrana bacteriana separando las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, permitiendo que los iones abandonen el citoplasma (Burt, 2004) .

Se pudo observar que *S. aureus* fue la bacteria más sensible en películas que contienen AEO, mientras que *E. coli* fue una de las más resistente. Esta diferencia de sensibilidad entre los microorganismos está de acuerdo con los datos reportados previamente para películas con AEO (Benavides *et al.*, 2012). En un estudio de Seydim y Sarikus (2006), las películas que contienen aceite esencial de orégano fueron más eficaces contra *S. aureus* que otros grampositivos y bacterias gramnegativas probadas. Benavides *et al.*, (2012) informó que las películas biodegradables producidas con AEO mostraron zonas de inhibición más grandes para cepas bacterianas grampositivas como *S. aureus* y *L. monocytogenes* y pequeñas zonas de inhibición para bacterias gramnegativas (*S. enteritidis* y *E. coli*). Debiagi, Kobayashi, Nakazato, Panagio y Mali, (2014) observaron que *B. cereus* grampositivo era más altamente inhibido por el AEO en comparación con *E. coli* gram- negativo. En general, los aceites esenciales son algo más eficaces contra bacterias grampositivas que gramnegativas. Burt (2004), explica este comportamiento debido a la presencia de una membrana externa ubicada alrededor de la pared celular en bacterias gramnegativas, limitando la difusión de sustancias hidrófobas mediante su recubrimiento de lipopolisacáridos (Burt, 2004) . La actividad antimicrobiana del AEO ante a algunos microorganismos y contra otros no, puede deberse según Benavides *et al.* (2012), a una pérdida parcial de compuestos volátiles durante la fabricación de películas, razón posible por la que se podría explicar este resultado.

Sin embargo, para *S. aureus* y *B. cereus*, estos resultados demuestran que el AEO puede inmovilizarse en la matriz de almidón y, en consecuencia, impedir el desarrollo de microorganismos.

4.3.2. Determinación de la concentración (%)

En base a los resultados obtenidos y el análisis realizado anteriormente, se decide seleccionar la concentración del 1% de AEO para la formulación y caracterización de biopelículas.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE BIOPELÍCULAS A BASE DE UNA MEZCLA DE ALMIDÓN DE MAÍZ-PAPA, SORBITOL Y ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*)

Después de determinar la mejor formulación de la biopelícula y la concentración de aceite esencial de orégano para su adición, se realiza la caracterización de la biopelícula en base a sus propiedades mecánicas, físicas y antimicrobianas, así como la comparación con la biopelícula control, sin adición de AEO, las películas se muestran en el anexo 7. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y Tabla 12.

La superficie de las biopelículas con AEO presentaron una reducción de la homogeneidad con presencia de poros más pronunciados en la superficie. La hidrofobicidad del aceite y su diferencia de densidad con la solución acuosa de almidón puede afectar la estabilidad de la solución filmogénica y consecuentemente formar estructuras heterogéneas debido a la separación de fases y presencia de poros (Amaral do Evangelho *et al.*, 2019, citando a Phan *et al.*, 2002).

Tabla 11

Caracterización de la biopelícula con formulación seleccionada: 60% sorbitol, 95°C temperatura de proceso, 50% Almidón de maíz: 50% Almidón de papa y 1% AEO.

Muestras al 1% AEO	Espesor (mm)	Resistencia a la Tracción (MPa)	Elongación (%)	Actividad	Actividad
				Antimicrobiana <i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	Antimicrobiana <i>Bacillus cereus</i> (mm)
1	0.06	3.49	27.82	7.85	6.23
2	0.07	3.60	32.35	8.26	7.01
3	0.07	3.96	28.93	8.41	5.89
4	0.08	5.08	31.72	8.90	6.13
Promedio	0.07	4.03	30.21	8.36	6.32
Desviación Estándar	0.0063	0.7244	2.1764	0.4336	0.4848

Fuente: Autoría propia, 2020.

Tabla 12

Caracterización de la biopelícula control con formulación seleccionada: 60% sorbitol, 95°C temperatura de proceso, 50% Almidón de maíz: 50% Almidón de papa y s/ AEO.

Muestras Control	Espesor (mm)	Resistencia	
		a la Tracción (MPa)	Elongación (%)
1	0.11	5.94	14.74
2	0.11	6.13	14.65
3	0.1	6.52	14.71
4	0.1	5.98	14.60

Promedio	0.11	6.14	14.68
Desviación	0.0058	0.2646	0.0624
Estándar			

Fuente: Autoría propia, 2020.

4.4.1. Propiedades Mecánicas

a) Resistencia a la Tracción (RT) y Elongación (E)

La resistencia a la tracción para biopelículas al 1% de AEO muestra menores valores de RT, con promedio de 4.03 MPa, a comparación de las biopelículas control con un valor de 6.14 MPa, esta variación se debe a la incorporación del aceite esencial de orégano en la matriz polimérica, tal como se muestra en la figura 25. Así mismo, las biopelículas al 1% de AEO muestran mayores valores de E, con promedio de 30.21 %, a diferencia de las biopelículas control con un valor de 14.68 %, esta oscilación se debe a que el aceite esencial actúa como un plastificante aumentando la flexibilidad de la biopelícula, este comportamiento se muestra en la figura 26. Liu *et al.* (2018) reportó que películas con 0% de AEO mostraron valores más altos de RT y valores más bajos de E, a comparación de muestras con 1, 3 y 5% de AEO, debido a que la presencia de gotitas de aceite en películas a base de biopolímeros conlleva a la separación de fases, este hecho es resultado de la dificultad para formar especies lipofílicas en una matriz cohesiva. Souza, Goto, Minardi, Coelho y Tadini (2013), reportan el mismo comportamiento en biopelículas control de almidón de yuca y con aceite esencial de canela, concluyendo que la introducción de aceite esencial reduce la interacción molecular entre cadenas poliméricas dando como resultado: materiales con menor resistencia a la tracción.

Acosta (2014), citando a Ahmad, Benjakul, Prodpran y Winarni (2012), afirma que las reacciones de los aceites esenciales se producen por la influencia del tipo y concentración de aceite

esencial, por la naturaleza de la matriz del polímero, por las interrelaciones específicas entre sus compuestos, por el método de homogenización, el cual establece el área efectiva de interacción entre elementos de la matriz polímero-aceite. La alta fragilidad de la matriz se debe al enorme número de discontinuidades en una estructura heterogénea, produciéndose biopelículas con gran cantidad de fase dispersa, este comportamiento se presenta con la incorporación excesiva de aceites esenciales y algunos compuestos no poliméricos inmiscibles con la matriz. A pesar de ello, a niveles y métodos de incorporación adecuados de aceite esencial se pueden reforzar las biopelículas mediante interrelaciones específicas entre sus compuestos.

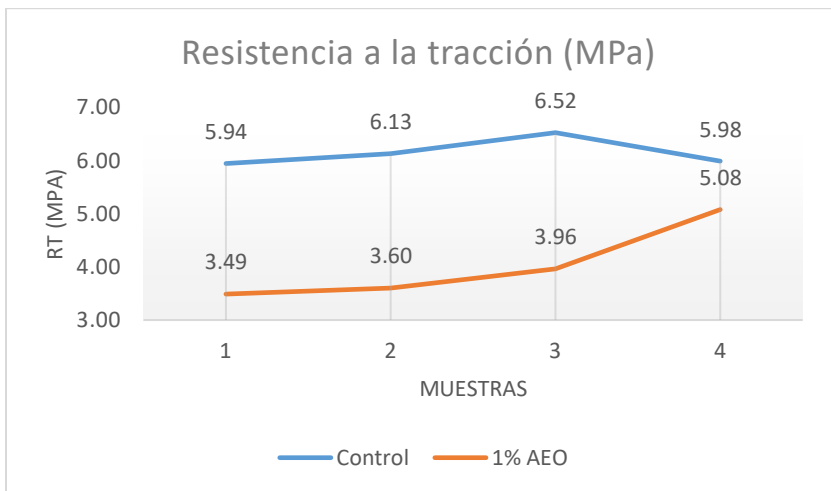


Figura 25. Comparación de la resistencia a la tracción de biopelículas Control (0% AEO) y biopelículas al 1% AEO. Fuente: Autoría propia, 2020.

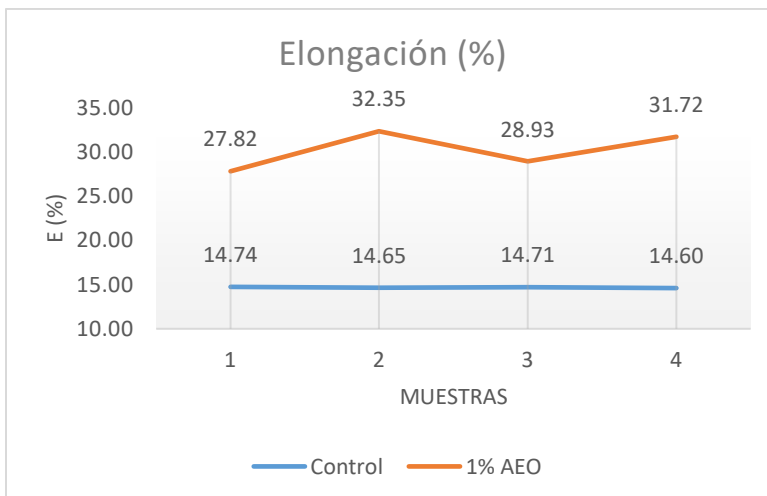


Figura 26. Comparación de la elongación de biopelículas Control (0% AEO) y biopelículas al 1% AEO. Fuente: Autoría propia, 2020.

4.4.2. Propiedades Físicas

a) Espesor

Los tratamientos presentaron una diferencia significativa ($P < 0,05$). Para las biopelículas con 1% de AEO, se observa un menor espesor con promedio 0.07 mm, a comparación de las biopelículas control con un espesor de 0.11 mm, este comportamiento se observa en la figura 27. Este resultado indicó que las aglomeraciones de pequeñas partículas de aceite esencial en la película no tuvieron un efecto pronunciado sobre el espesor, algunas de las causas podrían ser la eficaz homogenización de la emulsión, la volatilización del aceite esencial durante la elaboración y secado, etc. Este resultado no se relaciona con lo reportado por Song, Zuo y Chen (2017) donde el espesor no tuvo un efecto pronunciado al aumento. De igual forma, contradice lo afirmado por Amaral do Evangelho *et al.* (2019), quien menciona que la incorporación de aceite esencial de naranja aumentó el espesor de las películas atribuyendo este comportamiento a la red de microgotas de aceite esencial en la matriz polimérica, plegando la compacidad de la estructura de la matriz de almidón.

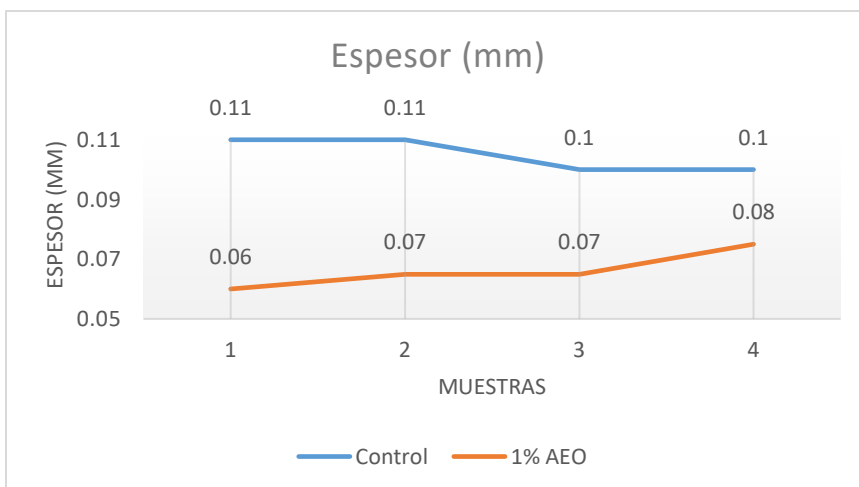


Figura 27. Comparación del espesor de biopelículas Control (0% AEO) y biopelículas al 1% AEO.

Fuente: Autoría propia, 2020.

4.4.3. Propiedades Antimicrobianas

a) Actividad antimicrobiana

Tal como se reportó anteriormente, la actividad antimicrobiana de la biopelícula al 1% de almidón se presenta frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, siendo más efectiva frente a *S. aureus* como se aprecia en la figura 28.

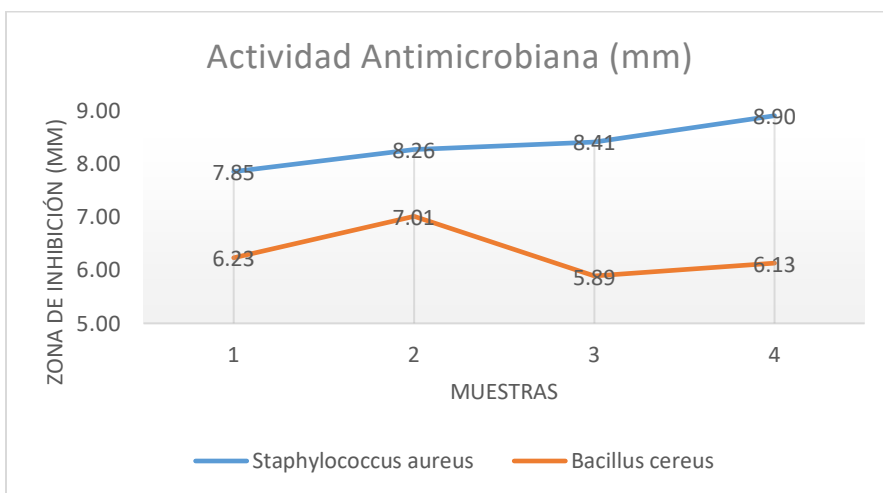


Figura 28. Comparación de la actividad antimicrobiana de biopelículas al 1% AEO. Fuente:

Autoría propia, 2020.

Según los valores presentados en la Tabla 13 para algunos plásticos, el polietileno de baja densidad presenta la resistencia a la tracción más cercana a la biopelícula formulada al 1% de AEO (4.03 MPa), mientras que la elongación (30.21 %) presenta una alta variación con respecto al polietileno de baja y alta densidad, polipropileno y celofán.

Tabla 13

Propiedades mecánicas de algunos plásticos utilizados en la industria alimentaria

Material	Resistencia la Tracción (MPa)	Elongación (%)
Polietileno de baja densidad	9-17	500
Polietileno de alta densidad	17-35	300
Polipropileno	42	300
Celofán	85.8 ± 8.9	-

Fuente: Krotcha (como se citó en Pandia, 2020).

5. CONCLUSIONES

- La mejor formulación de la biopelícula fue 60% de sorbitol, 95°C temperatura de proceso y 50% almidón de maíz: 50% almidón de papa, cuyo valor de resistencia a la tracción es 6.23 MPa y de elongación 14.67 %.
- Las biopelículas al 2.5 % de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) presentaron mayor inhibición de la cepa *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* frente a las de 1% de AEO, sin embargo, la biopelícula al 1% presentó mejor apariencia física.

- Las biopelículas al 1% de AEO presentaron espesor de 0.07 mm y propiedades mecánicas de 4.03 MPa en resistencia a la tracción y 30.21 % de elongación.

6. RECOMENDACIONES

- Profundizar el estudio de biopelículas con diversas mezclas de almidones obtenidos a partir de residuos agroindustriales.
- Realizar la aplicación de biopelículas de esta formulación para determinar la efectividad del envase comestible.
- Aplicar como agente antimicrobiano aceites esenciales a partir de residuos agroindustriales

LISTA DE REFERENCIAS

1. Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842. doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.021
2. Acosta, D. S. (2014). *Propiedades de films de Almidón de Yuca y Gelatina. Incorporación de aceites esenciales con efecto antifúngico* (tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
3. Amador, L. C. (2014). *Obtención, purificación y caracterización de almidón de raíz de calabacilla loca (Cucurbita foetidissima HBK) y sus potenciales aplicaciones* (tesis pregrado). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Buenavista, México.
4. Amaral do Evangelho, J., Silva, G., Biduski, B., Mello el Halal, S., Huttner, D., Arocha, M., Fiorentini, A. y Rosa, E. (2019). Antibacterial activity, optical, mechanical and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 222, 1-8. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.114981
5. Arredondo, O. T. (2012). *Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco* (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro, México.
6. Ávila, S. R., Palou, E., Munguía, M. T., Nevárez, M. G., Cruz, A. R., y López, M. A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 66-72. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.017

7. Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos*. Ciudad de México, México: PEARSON Education. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Libro-Badui2006_26571.pdf
8. Ballesteros, L., Pérez, C., Andrade, R. (2020) Effect of glycerol and sorbitol concentrations on mechanical, optical, and barrier properties of sweet potato starch film. *NFS Journal*, 20, 1-9. doi: 10.1016/j.nfs.2020.06.002
9. Bemiller, J., Whistler, R. (Ed.). (2009). *Starch: Chemistry and technology*. Burlington, USA: Editorial Academic Press
10. Benavides, S., Villalobos, R. y Reyes, J. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and orange essential oil concentration. *J. Food Eng.* 110, 232–239.
11. Bósquez, M. E. y Vernon C. E. (2005). Efecto de plastificantes y calcio en la permeabilidad al vapor de agua de películas a base de goma de mezquite y cera de candelilla. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4(2), 157-162. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62040203>
12. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
13. Cagri, A., Ustunol, Z. y Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833-848. doi: 10.4315/0362-028X-67.4.833
14. Calo, J. Crandall, P. O'Bryan, C. Ricke, S. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54, 111-119. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
15. Calorie control. (2005). Reduce-Calorie sweetness sorbitol. Recuperado de:

<http://www.caloriecontrol.org/sorbitol.html>

16. Caamal, I., Pereira, F., Madera, T. (2011). Caracterización óptica y mecánica de películas comestibles a base de mezclas binarias de almidones de *Phaseolus lunatus* L, *Manihot esculenta* Crantz y *Zea mays* L. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12(1), 101-109. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81318808016>
17. Carmona, G. J., Cordobés, F., Guerrero C. A., Martínez, I. y Partal, L. P. (2007). Influencia del pH y de la fuerza iónica sobre la gelificación térmica de proteínas de la yema de huevo. *Grasas y aceites*, 58(3), 289-296. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11441/54857>
18. Chouhan, S., Sharma, K. y Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils – Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(58), 1-21. doi: 10.3390/medicines4030058
19. Corrales, M., Fernández, A. y Han, J. (2014). Antimicrobial Packaging Systems. In: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, San Diego, 133–170.
20. Dai, H., Chang, R. P., Geng, F., Yu, J., y Ma, X. (2010). Preparation and properties of starch-based film using N,N-bis(2-hydroxyethyl)formamide as a new plasticizer. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 306-311. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.08.012
21. Datta, D., Halder, G. (2019). Effect of media on degradability, physico-mechanical and optical properties of synthesized polyolefinic and PLA film in comparison with casted potato/corn starch biofilm. *Process Safety and Environmental Protection* 124, 39–62. doi: 10.1016/j.psep.2019.02.002
22. Debiagi, F., Kobayashi, R., Nakazato, G., Panagio, L. y Mali, S. (2014). Biodegradable active packaging based on cassava bagasse: polyvinyl alcohol and essential oils. *Ind. Crops Prod.* 52, 664–670.

23. Del Águila, V., Y. (2019). *Efecto de la concentración de aceite esencial de clavo de olor (Syzygium aromaticum) en la cobertura comestible y del tiempo de almacenamiento sobre la pérdida de peso, color, firmeza, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en trozos de piña (Ananas comosus) golden, mínimamente procesada.* (Tesis de pregrado). Recuperado de: http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/4608/1/RE_IND.ALIM_YANDIRA.DE.L.AGUILA_CONCENTRACION.DE.ACEITE.ESENCIAL_DATOS.PDF
24. Delgado, R. Y. (2018). *Aplicaciones de almidones nativos y modificados en la industria láctea y cárnica.* (Tesis de pregrado). Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3294/delgado-rimas-yenny.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
25. Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., Harispe, R. y Márquez, R. (2009). Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador. *Revista del Laboratorio tecnológico del Uruguay*, 4, 33-36.
26. Fakhreddin, S., Rezaei, M., Zandi, M. y Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*. 67, 403-413. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.01.062
27. Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A. y Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303. doi: 10.1016/j.tifs.2011.02.004
28. FAO. (2014). *Soluciones apropiadas para el envasado de alimentos en los países en desarrollo.* Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3684s.pdf>

29. FAO (Sin Fecha). Almidones modificados.
30. Fan, W. (2008). The use of tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chemistry*. 108(1) 148-153. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.10.057.
31. Gallegos, J. (2003). MAMUAL DE PRACTICAS DE MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS: BÁSICO. Acribia, España: Acribia.
32. Gómez, A. y López, A. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3(1), 33-45. Recuperado de: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Gomez-Sanchez-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Gomez-Sanchez-et-al-2009.pdf)
33. Gómez, J., Bravo, L., Gómez, M., Alemán, A., y Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112, 18-25.
34. Gross, A. R., Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297(5582), 803 – 807. doi: 10.1126/science.297.5582.803
35. Guo, K., Liu, T., Xu, A., Zhang, L., Bian, X., Wei, C. (2019). Structural and functional properties of starches from root tubers of white, yellow, and purple sweet potatoes. *Food Hydrocoll*, 89, 829–836, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.058>.
36. Gutiérrez, J. T., González S. P., Medina J. C., Famá, L., y Goyanes, S. (2017). Effect of filler properties on the antioxidant response of thermoplastic starch composites. *Handbook of Composites from Renewable Materials, Structure and Chemistry*, 1, pp. 337–369. Recuperado de:

- https://www.researchgate.net/publication/312167059_Effect_of_filler_properties_on_the_antioxidant_response_of_thermoplastic_starch_composites
37. Gutiérrez, H., De la Vara, R. (2012). Análisis y diseño de experimentos. Distrito Federal, México: McGraw-Hill Interamericana.
 38. Hernández, M.M., Torruco, J.G., Chel, L.G., Betancur, D.A. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 28(3), 718-726. Recuperado de: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612008000300031&script=sci_abstract
 39. Hong, S. I., Park, J. D. y Kim, D. M. (2000). Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. *Food Science and Biotechnology*, 9(1), 38-42.
 40. IEC Staff Industry. (2000). Sorbitol. Walter S. Fedor Associate Editor, New York.
 41. Iman, M., y Maji, T. K. (2012). Effect of crosslinker and nanoclay on starch and jute fabric based green nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 290–297. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.03.012
 42. Immergut, E. H., y Mark, H. F. (1965). Principles of plasticization. In R. F. Gould (Ed.), *Plasticization and Plasticizer Processes* (pp. 1–26). Washington, DC: American Chemical Society.
 43. Isoton, F., Bernardo, G., Baldasso, C., Rosa, L., Zeni, M. (2015). The plasticizer effect on preparation and properties of etherified corn starch films. *Industrial Crops and Products*, 76, 717 – 724. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.04.005
 44. Jaworek, A. T. y Sobczyk, A. T. (2008). Electro spraying route to nanotechnology: an overview. *Journal of electrostatics*, 66(3- 4), 197-219. doi: 10.1016/j.elstat.2007.10.001

45. Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. y Tanaka, M. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 449-458. doi: 10.1016/j. foodhyd.2007.01.00
46. Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P. y Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
47. Leiva, C.M.L., Obando, R.S.P. (2014). Extracción de almidón a partir de variedades de papa cultivadas en Nicaragua. (Tesis de pregrado). Recuperado de: <http://ribuni.uni.edu.ni/1472/>
48. Liu, Q., Wang, W., Qi, J., Huang, Q. y Xiao, J. (2018). Oregano essential oil loaded soybean polysaccharide films: Effect of Pickering type immobilization on physical and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 1-38. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.08.011
49. Lu, D. R., Xiao, C. M., Xu, S. J. (2009) Starch-based completely biodegradable polymer materials. *XPRESS Polymer Letters* 3(6), 366–375. doi: 10.3144/expresspolymlett.2009.46
50. Luc, A., Peter J. H. (2014). Starch Polymer: From the Field to Industrial Products 1(1), 3-10. doi: 10.1016/B978-0-444-53730-0.00018-X
51. Márquez, C. J., Trillos, O., Cartagena, J. R. y Cotes, J. M. (2009). Evaluación fisicoquímica y sensorial de frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Vitae*, 16(1), 42-48. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a05.pdf>
52. Martínez M. A. (2003). *Aceites esenciales*. Medellin, Colombia: Universidad de Antioquia. Recuperado de: <http://www.med->

- informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
53. McHugh, T. H. (2000). Protein-Lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung*, 44: 148-151. doi: 10.1002/1521-3803 (20000501)44:33.0.CO;2-P
 54. Ministerio del Ambiente. (Sin Fecha). *Cifras del mundo y el Perú*. Lima, Perú. R. Recuperado de http://www.minam.gob.pe/menos-plastico-mas-vida/cifras-del-mundo-y-el-peru/#_ftnref1
 55. Ministerio de Agricultura y Riego (2019). Plan Nacional de Cultivos. Campaña Agrícola 2019-2020. Lima, Perú. Recuperado de https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/471867/Plan_Nacional_de_Cultivos_2019_2020b.pdf
 56. Miranda, S. P., Cárdenas, G., López, D. y Lara, S. A. (2003). Comportamiento de películas de Quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(4), 331-336. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rsqm/v47n4/v47n4a8.pdf>
 57. Monroy, V. A., Cano, S. C., Alamilla, B. L., Hernández, S. H. y Gutiérrez, L. G. (2014). Coupled taguchi-rsm optimization of the conditions to emulsify α -tocopherol in an Arabic gum-maltodextrin matrix by microfluidization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3), 679-688. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v13n3/v13n3a3.pdf>
 58. Montoya C. G. (2010). *Aceites esenciales. Una alternativa de diversificación para el eje cafetero*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Edición 1. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>

59. Morales, C. J. F. (2007). Síntesis del sorbitol a partir de glucosa por vía electroquímica y determinación del contenido del mismo en 23 frutas comunes y exóticas del Ecuador. (Tesis de pregrado). Recuperado de: <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2790>
60. Muñoz, D. (2018). *Consumo responsable del plástico y reducción del plástico de un solo uso*. Lima, Perú: Ministerio del ambiente. Recuperado de http://www.congreso.gob.pe/Docs/comisiones2018/PueblosAndinosEcologia/files/ppt_ministra_del_ambiente_4-9-2018.pdf
61. Ojogbo, E., Ogunsona, E.O., Mekonnen, T.H. (2019). Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials, *Materials Today Sustainability*, 7-8. 1-76. doi: 10.1016/j.mtsust.2019.100028
62. Origanum vulgare L.essential oil. *Industrial Crops and Products* 67, 403–413. doi: 0.1016/j.indcrop.2015.01.062
63. Ortega, A. (2018). *Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (Thymus vulgaris) y orégano (Origanum vulgare) frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC:12600*. (Tesis de pregrado). Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16043/1/UPS-CT007779.pdf>
64. Orsuwan, A., Sothornvit, R. (2018). Effect of banana and plasticizer types on mechanical, water barrier, and heat sealability of plasticized banana-based films, *J. Food Processing and Preservation*. 42 (1)e13380, 1-8. doi: 10.1111/jfpp.13380.
65. Pandia, E. S. (2020). *Obtención de películas comestibles empleando gelatina de pescado y extracto de orégano, y utilización como recubrimiento en filetes de trucha* (Tesis de postgrado). Recuperado de:

<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/4345/pandia-estrada-silvia-elvira.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

66. Pazmiño, A., Campuzano, A. y Marín, K. (2020). Inhibición del crecimiento de *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* por efecto del aceite esencial de orégano en una película biodegradable activa de ácido poliláctico. *Revista Bases de la Ciencia*, 5(1), 41-50. Recuperado de: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/2035/2614>
67. Pellissari, F., Grossmann, M., Yamashita, F., y 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, 7499–7504.
68. Ramos, G. M., Bautista, B. S., Barrera, N. L., Bósquez, M. E., Alia, T. I. y Estrada, C. M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1), 44-57. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a5.pdf>
69. Real, D. A., Martinez, M. V, Frattini, A., Soazo, M., Luque, A. G., Biasoli, M. S., ... Leonardi, D. (2013). Design, Characterization, and In Vitro Evaluation of Antifungal Polymeric Films. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 64–73.
70. Salinas, S. V., Trejo, M. M. y Lira, V. A. (2015). Propiedades físicas, mecánicas y de barrera de películas comestibles a base de mucílago de Nopal como alternativa para la aplicación en frutos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 193-198. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/813/81343176007.pdf>
71. Seydim, A.C., Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based ediblefilms incorporated with oregano: rosemary and garlic essential oils. *Food Res.Int.* 39, 639–644.

72. Sharma, S. y Rao, T. R. (2015). Xanthan gum based edible coating enriched with cinnamic acid prevents browning and extends the shelf-life of fresh-cut pears. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 791-800. doi: 10.1016/j.lwt.2014.11.050
73. Sociedad Nacional de Industrias. (2019). *Reporte Sectorial* (N° 04 – 2019). Recuperado de https://www.sni.org.pe/wp-content/uploads/2019/07/Reporte-Sectorial-PI%C3%A1sticos_2019.pdf
74. Song, X., Zuo, G. y Chen, F. (2017). Effect of esencial oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-32. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.114
75. Sothornvit, R., y Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of betalactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50(3), 149–155. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877400002375>
76. Souza, A., Goto, G., Minardi, J., Coelho, A. y Tadini, C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *Food Science and Technology*, 54, 346-352. doi 10.1016/j.lwt.2013.06.017
77. SPI Polyols Inc. (2003). What are polyols. Recuperado de: www.spipolyols.com/whatarepolyols.html
78. Sundays of Sousa, F., Holland-Araújo, M.L., Rodrigues De Souza J.R., et al. (2017). Physicochemical Properties of Edible Seed Hemicelluloses. *Open Access Library Journal* 4(e3683). doi: 10.4236 / oalib.1103683

79. Teramoto N., Motoyama T., Yosomiya R., Shibata M. (2003). Synthesis, thermal properties, and biodegradability of propyl-etherified starch. *European Polymer Journal*, 39, 255-261. doi: 10.1016/S0014-3057(02)00199-4
80. Thakur, R., Pristijono, P., Scarlett, C., Bowyer, M., Vuong, Q. (2019). Starch-based films: Major factors affecting their properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-39. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.190
81. Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable film and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Science & Technology* 14, 71 – 78. Recuperado de: <https://kundoc.com/pdf-biodegradable-films-and-composite-coatings-past-present-and-future-.html>
82. Trejo, V., Aragón, N. y Miranda, P. (2001). Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(1), 01-05. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rsqm/v45n1/v45n1a1.pdf>
83. Vartiainen, J., Vähä, M. y Harlin, A. (2014). Biopolymer films and coatings in packaging applications—a review of recent developments. *Materials Sciences and applications*, 5(10), 708. doi: 10.4236/msa.2014.510072
84. Veiga-Santos, P., Oliveira, L. M., Cereda, M. P., y Scamparini, A. R. (2007). Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch-gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. *Food Chemistry*, 103(2), 255–262. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.048
85. Videki, B., Klebert, S., y Pukanszky, B. (2007). External and internal plasticization of cellulose acetate with caprolactone: Structure and properties. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 45(8), 873–883.

86. Weber J.C. (Ed.). (2000). *Biobased Packaging Materials for the Food Industry: Status and Perspectives*. Frederiksberg, Dinamarca: Royal Veterinary and Agricultural University (KVL). Recuperado de: http://www.bc.bangor.ac.uk/_includes/docs/pdf/biobased%20packaging%20materials.pdf
87. Whistler, R., BeMiller, J., Paschall, E. (1984). *Starch Chemistry and Technology*. San Diego, California: ACADEMIC PRESS.
88. Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J. y Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Science Direct*, 1-10. doi: 10.1016/j.foodres.2014.04.004
89. Xie, F., Halley, P. J., Avérous, L. (2012) Rheology to understand and optimize processibility, structures and properties of starch polymeric materials. *Progress in Polymer Science* 37, 595-623. Recuperado de https://www.academia.edu/15015306/Rheology_to_understand_and_optimize_processibility_structures_and_properties_of_starch_polymeric_materials
90. Yang, L. & Paulson, A. T. (2000a). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food research international*, 33(7), 571-578. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00093-4
91. Yang, L. y Paulson, A. T. (2000b). Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33(7), 563-570. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00092-2

92. Zhong, Y., Godwin, P., Jin, Y., y Xiao, H. (2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 27-35. doi: 10/1016/j.aiepr.2019.11.002

ANEXOS

ANEXO 1. Modelo de Informe de resultados emitido por el texturómetro.

INFORME DATOS

Descripción Muestra

Nombre Producto: almidon
 Nombre de lote: A1 .48h.acond.
 Ejemplo: 1
 Dimensiones:
 Forma: Cilindro
 Longitud: 0.00 mm
 Anchura: 0.00 mm
 Altura: 0.00 mm

Notas:

Método Test

Fecha: 28/03/2006
 Hora: 12:44:00 a.m.
 Tipo de Test: Tensión
 Tpo. Recuperación: 0 s
 Objetivo: 50.0 mm
 Mismo activador: Falso
 Esperar t.: 0 s
 Velocidad Pretest: 2 mm/s
 Carga Activación: 15.0 g
 Fr. Muestreo: 10 puntos/seg
 Vel. Test: 1 mm/s
 Sonda: TA10
 Velocidad Vuelta: 4.5 mm/s
 Elemento: TA-RT-KI
 Contador ciclos: 1
 Celda Carga: 1500g

Resultados

Pico Carga: 284.2 g
 Deformación según Pico Fuerza: 42.97 mm
 Trabajo: 35.69 mJ
 Carga Final: -14.2 g

INFORME DATOS

Descripción Muestra

Nombre Producto: almidon
 Nombre de lote: C14 A
 Ejemplo: 1
 Dimensiones:
 Forma: Cilindro
 Longitud: 0.00 mm
 Anchura: 0.00 mm
 Altura: 0.00 mm

Notas:

Método Test

Fecha: 28/03/2006
 Hora: 01:15:50 a.m.
 Tipo de Test: Tensión
 Tpo. Recuperación: 0 s
 Objetivo: 15.0 mm
 Mismo activador: Falso
 Esperar t.: 0 s
 Velocidad Pretest: 2 mm/s
 Carga Activación: 20.0 g
 Fr. Muestreo: 10 puntos/seg
 Vel. Test: 1 mm/s
 Sonda: TA10
 Velocidad Vuelta: 4.5 mm/s
 Elemento: TA-RT-KI
 Contador ciclos: 1
 Celda Carga: 1500g

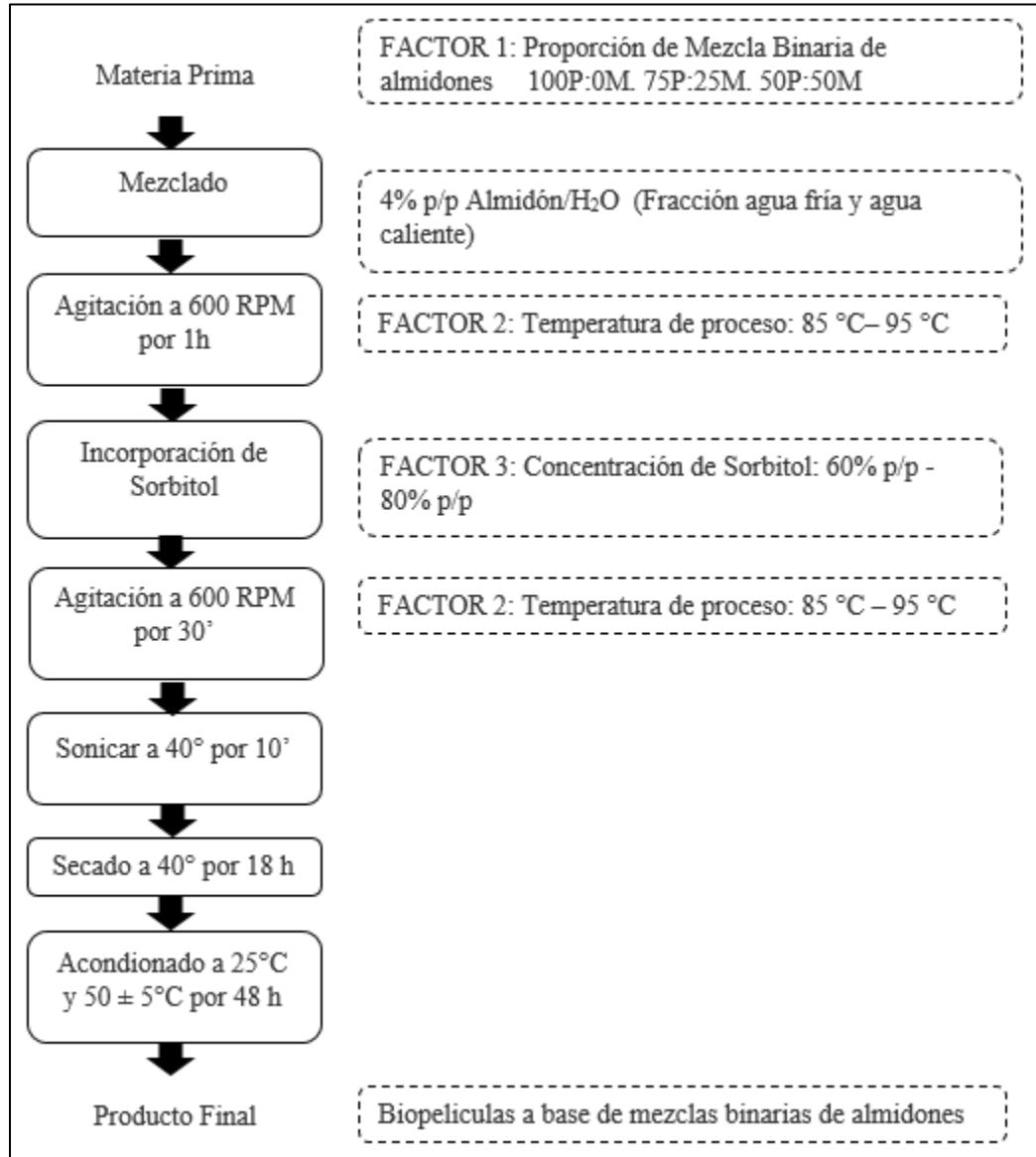
Resultados

Pico Carga: 1685.8 g
 Deformación según Pico Fuerza: 1.46 mm
 Trabajo: 10.18 mJ
 Carga Final: 1685.8 g

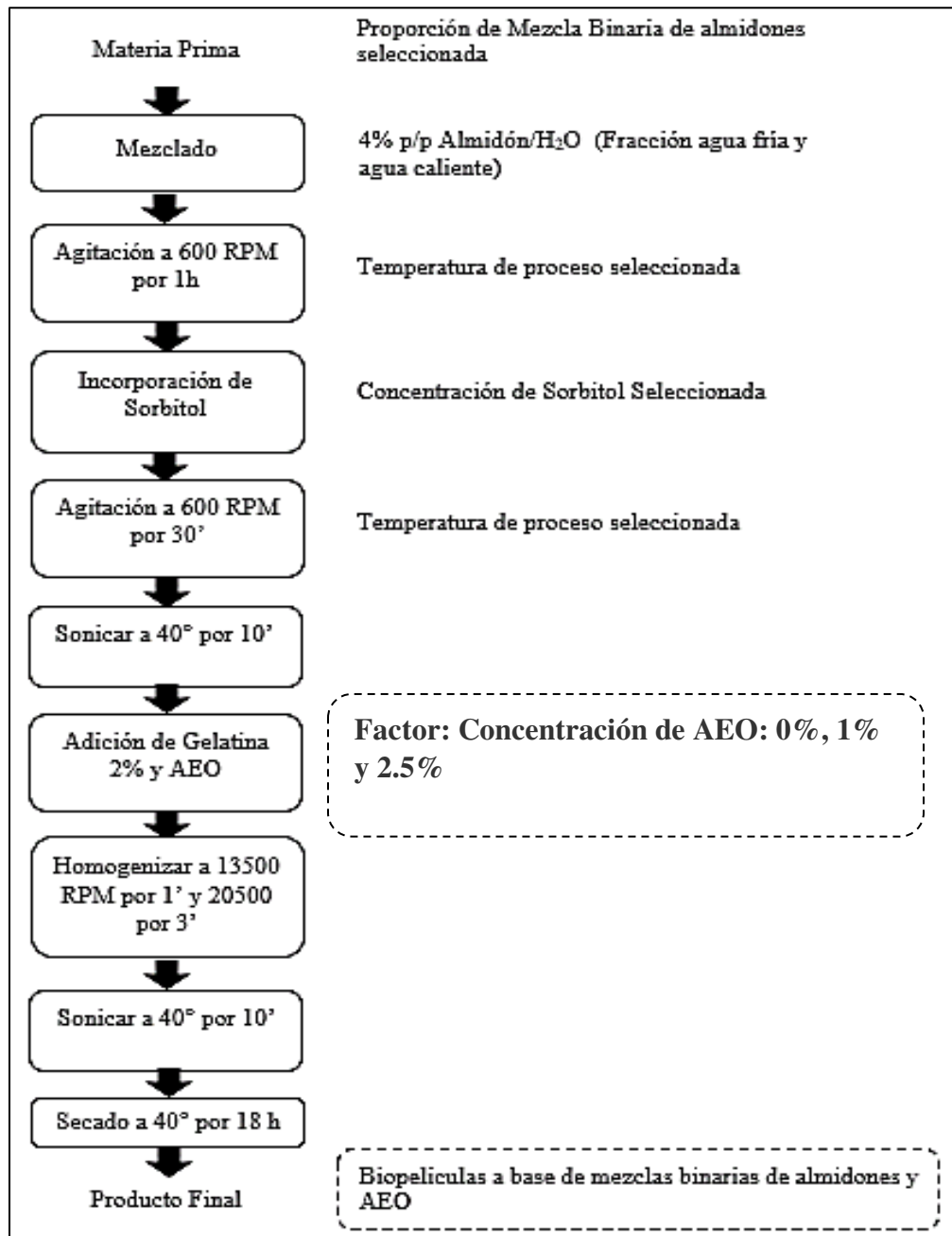
Resultados

Pico Carga: 1685.8 g
 Deformación según Pico Fuerza: 1.46 mm
 Trabajo: 10.18 mJ
 Carga Final: 1685.8 g

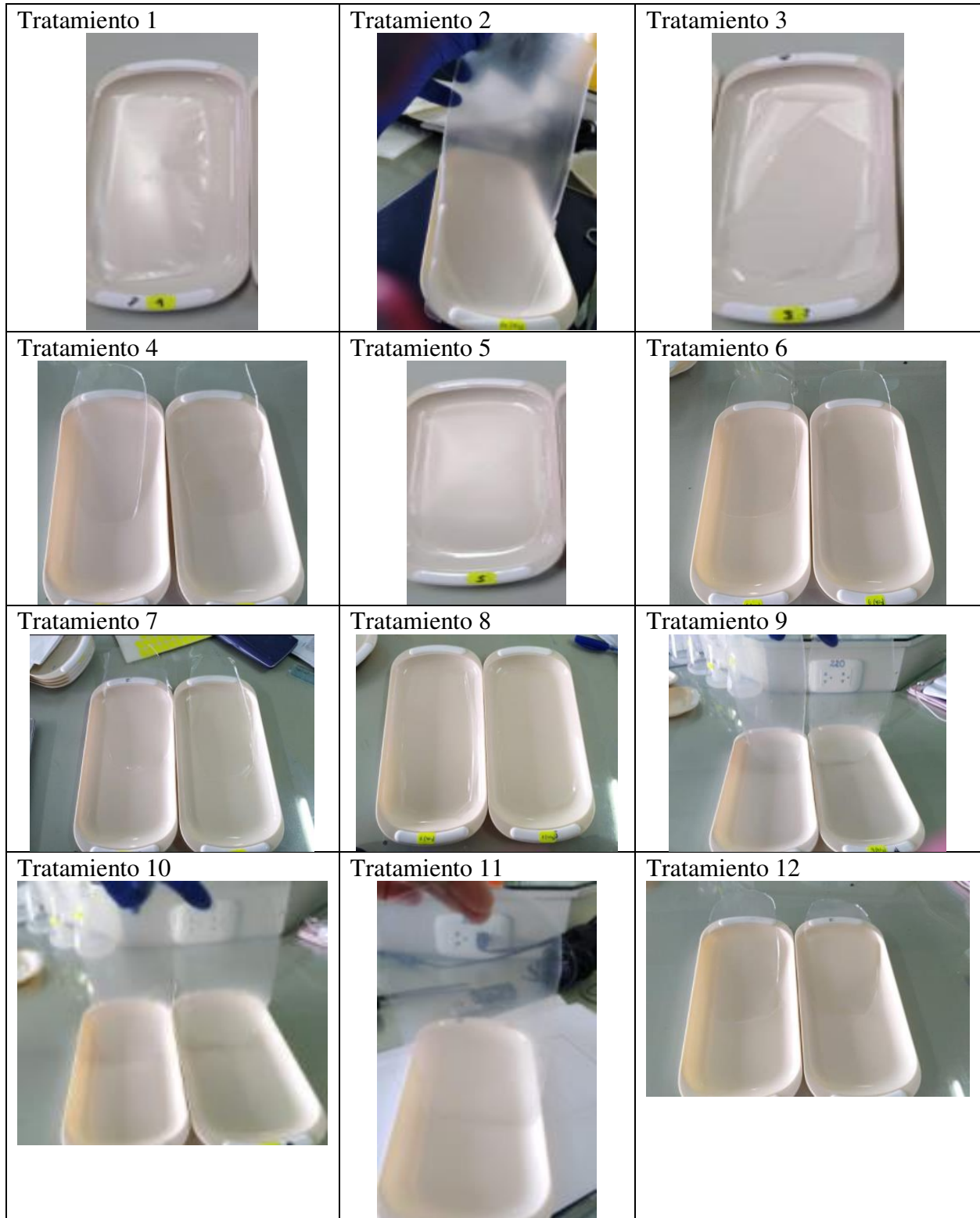
Anexo 2. Flujo de operaciones para la elaboración de biopelículas a base de mezcla de almidón de maíz - papa y sorbitol.



Anexo 3. Flujo de operaciones para la elaboración de biopelículas a base de mezcla de almidón de maíz - papa, sorbitol y AEO



Anexo 4. Imágenes de biopelículas del diseño factorial multinivel



Anexo 5. Análisis de Varianza para Resistencia a la Tracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración de Sorbitol	21.1876	1	21.1876	169.66	0.0000
B: Temperatura de Proceso	0.948037	1	0.948037	7.59	0.0141
C: Proporción de AMaíz y APapa	14.9963	1	14.9963	120.08	0.0000
AB	2.07094	1	2.07094	16.58	0.0009
AC	1.33981	1	1.33981	10.73	0.0048
CC	5.94317	1	5.94317	47.59	0.0000
Bloques	0.0287042	1	0.0287042	0.23	0.6381
Error total	1.99815	16	0.124884		
Total (corr.)	48.5127	23			

R-cuadrada = 95.8812 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 94.0792 por ciento
Error estándar del est. = 0.35339
Error absoluto medio = 0.232674
Estadístico Durbin-Watson = 2.212 (P=0.5298)
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.139154

Anexo 6. Análisis de Varianza para Elongación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración de Sorbitol	528.376	1	528.376	72.52	0.0000
B: Temperatura de Proceso	232.193	1	232.193	31.87	0.0000
C: Proporción de AMaíz y APapa	15.7014	1	15.7014	2.15	0.1615
AB	0.0852042	1	0.0852042	0.01	0.9152
AC	18.9008	1	18.9008	2.59	0.1268
CC	35.7938	1	35.7938	4.91	0.0415
Bloques	4.6552	1	4.6552	0.64	0.4358
Error total	116.583	16	7.28641		
Total (corr.)	952.287	23			

R-cuadrada = 87.7576 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 82.4016 por ciento
Error estándar del est. = 2.69934
Error absoluto medio = 1.72458
Estadístico Durbin-Watson = 2.69611 (P=0.9209)
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.365744

Anexo 7. Biopelículas con la mejor formulación, control y al 1% de AEO.

